GUIA DE FINALIZAÇÃO HUMANITÁRIA APLICADA A ROEDORES UTILIZADOS EM PESQUISAS



FIOCRUZ

ICTB Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos

Atena Editora

Ano 2023

KLENA SARGES MARRUAZ DA SILVA
MONIQUE RIBEIRO DE LIMA
organizadoras

GUIA DE FINALIZAÇÃO HUMANITÁRIA APLICADA A ROEDORES UTILIZADOS EM PESQUISAS



FIOCRUZ

ICTB
Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos

Atena Editora
Ano 2023

KLENA SARGES MARRUAZ DA SILVA
MONIQUE RIBEIRO DE LIMA
organizadoras

Editora chefe
Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira
Editora executiva
Natalia Oliveira
Assistente editorial
Flávia Roberta Barão
Bibliotecária
Janaina Ramos
Projeto gráfico
Camila Alves de Cremo
Ellen Andressa Kubisty
Luiza Alves Batista
Nataly Evilin Gayde
Thamires Camili Gayde
Capa
Klena Sarges, DALL-E 2

CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Guia de finalização humanitária aplicada a roedores utilizados em pesquisas

Diagramação: Ellen Andressa Kubisty
Correção: Yaiddy Paola Martinez
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Organizadoras: Klena Sarges Marrvaz da Silva
Monique Ribeiro de Lima

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S586 Guia de finalização humanitária aplicada a roedores utilizados em pesquisas / Organizadoras Klena Sarges Marrvaz da Silva, Monique Ribeiro de Lima. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2023.

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
ISBN 978-65-258-1582-4
DOI: https://doi.org/10.22533/at.ed.824231008

1. Roedores em cativeiro e em laboratório. 2. Bem-estar animal. I. Silva, Klena Sarges Marrvaz da (Organizadora). II. Lima, Monique Ribeiro de (Organizadora). IV. Título.

CDD 636.088

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

CIÊNCIAS AGRÁRIAS

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

CIÊNCIAS AGRÁRIAS

DECLARAÇÃO DA EDITORA

Aos verdadeiros protagonistas de muitas descobertas científicas, os animais de pesquisa, e aos incansáveis guardiões de sua saúde e bem-estar, os médicos veterinários que atuam nas instalações de animais utilizados em pesquisas, dedicamos, sempre guiadas pelo compromisso com a ciência, a compaixão e o respeito por todas as formas de vida.

Ética. Respeito. Bem-estar. Humanidade. Perícia. Progresso. Se eu tivesse que escolher algumas palavras-chave para este livro, com certeza estas estariam entre elas e, creio eu, em conjunto representam simbolicamente o conteúdo que é nele apresentado.

Uma boa parte da evolução do conhecimento ao longo dos séculos se deve à experimentação com animais, utilizados como modelos para estudos de anatomia, fisiologia e patologia, entre outras disciplinas. Esse próprio conhecimento, intrinsecamente, fez-nos evoluir de uma premissa que tais animais seriam, por exemplo, incapazes de sentir dor, para uma percepção mais humana de que estes, assim como nós, possuem senciência, ou seja, através dos sentidos, sentem, entendem e percebem o que está ao seu redor e as intervenções que lhes são impostas.

Esta questão vem, já há algum tempo, provocando intenso debate no meio acadêmico e na sociedade, dada a alta probabilidade de produção de danos significativos nos animais sob experimentação. Nesse contexto, em 1954, a Federação das Universidades para o Bem-Estar Animal dos Estados Unidos decidiu patrocinar uma pesquisa sistemática sobre o progresso da técnica humana em laboratório, a qual culminou, anos mais tarde (1959), na publicação do livro: *The Principles of Human Experimental Technique*, pelos cientistas Willian M. S Russel e Rex L. Burch. Nessa obra, os autores introduzem o Princípio dos 3Rs, relativos à substituição (*Replacement*), à redução (*Reduction*) e ao refinamento (*Refinement*) na experimentação animal, bem atuais e em desenvolvimento nos dias de hoje.

Muito tem sido discutido sobre a adoção de alternativas de substituição desses animais por outros modelos, como ensaios *in vitro* com culturas de células e modelos matemáticos. Por outro lado, a experimentação com animais em pesquisas biomédicas ainda hoje é inevitável devido à escassez de modelos alternativos que possam, por exemplo, garantir com segurança o desenvolvimento e a utilização de bioprodutos com aplicação médica humana e veterinária, justificando-se, portanto, ao projetar expectativa de benefício para a sociedade ou para os animais. Assim, vem sendo buscada a redução do número de animais utilizados em cada experimento, tanto a partir de uso de outras fontes de material biológico, como o depositado em coleções biológicas, biobancos e biorrepositórios, quanto o emprego de métodos como exames radiológicos, telemetria não-invasiva e inteligência artificial, que aliam cuidados com o bem-estar animal e a obtenção de informações.

Em um contexto científico mundial no qual a reprodutibilidade das pesquisas científicas está sob o microscópio, devemos atentar que a excelência das pesquisas que envolvem experimentação animal está diretamente

relacionada ao uso humanitário de animais de laboratório, alinhado ao princípio dos 3Rs, principalmente o Refinamento, voltado ao bem-estar animal. Nesse âmbito, uma ação fundamental é a antecipação da remoção de um animal envolvido em procedimento de experimentação, com vistas à prevenção, redução ou resolução de quadro de dor, desconforto ou distresse que possa estar sendo por ele apresentado, o que é denominado de ponto final humanitário (*humane endpoint*).

Escrito por profissionais com larga experiência na experimentação animal em diferentes campos do conhecimento e de diversas instituições brasileiras, este livro coloca o bem-estar animal e a finalização humanitária como focos principais, mas vai muito além de reunir orientações de atuação prática, na medida em que realiza uma contextualização ampla de vários elementos que o orbitam. Nesse sentido, os diferentes colaboradores da obra dissertam inicialmente sobre aspectos gerais da Experimentação Animal e sobre a Cultura do Cuidado, passam pelo acompanhamento clínico dos animais em diversas situações experimentais (infecções experimentalmente induzidas, câncer, radiação ionizante, alterações ósseas como osteoporose e tumores ósseos, procedimentos cirúrgicos e produção de anticorpos policlonais), discutem questões referentes à padronização de procedimentos e o controle de qualidade e segurança na experimentação, e chegam até os procedimentos de manejo de dor e eutanásia humanitária.

Além disso, são aqui discutidas questões relacionadas à legislação voltada à experimentação com animais, com menção específica à Lei Arouca (Lei nº 11.794/ 2008), que criou o CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e determinou a criação das CEUAs (Comissões de Ética no Uso de Animais), e que está completando 15 anos. Aliás, a legislação deve proteger tanto os animais utilizados como biomodelos quanto os profissionais que atuam na Ciência em Animais de Laboratório, profissionais estes muitas vezes submetidos a intensa carga de estresse psíquico e exaustão emocional, muitas vezes gerando a chamada “fadiga por compaixão”.

Ainda dentro dos arcabouços norteador e normativo, o livro menciona também, ao longo de seus diferentes capítulos, diversos *guidelines* adotados por diferentes países, como Canadá, Estados Unidos, Reino Unido e Nova Zelândia, alguns deles, inclusive, com orientações específicas para algumas áreas de experimentação animal, como a oncologia.

A Ética, sim, aquela com letra maiúscula e com mais de 2.500 anos, enquanto convenção social que protege valores, como aquele baseado na consideração com o outro (não necessariamente um outro ser humano), permeia todo o texto e convida a reflexões importantes.

Trata-se de uma obra que pode ser usufruída tanto na forma de uma leitura sequencial, cuidadosa e sistematizada sobre o tema do bem-estar animal e o ponto final humanitário, quanto de um guia de referência e consulta para todos aqueles que trabalham com experimentação animal - sejam pesquisadores de área biomédica que utilizam biomodelos em suas investigações ou profissionais que trabalham tanto com criação quanto com experimentação animal. Além de possuir nicho onde ainda há poucas publicações sistematizadas sobre o tema, em especial no Brasil, fornece conteúdo técnico importantíssimo à atuação na área e instiga reflexões que vão para muito além dela e que são motores de aperfeiçoamento e progresso da pesquisa biomédica.

Marcelo Pelajo Machado
Pesquisador em Saúde Pública
Laboratório de Medicina Experimental e Saúde, Instituto Oswaldo Cruz/
Fiocruz, Rio de Janeiro/ RJ

Em 2019, pouco antes de se iniciar a pandemia da COVID-19, fui procurada pela Daiani Campbell, interessada em apresentar um projeto sob minha orientação para a seleção no Mestrado em Ciência em Animais de Laboratório no Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Com ela, estava a Monique Lima, que se propunha a coorientá-la. O projeto inicial seria a apresentação de parâmetros de finalização humanitária para experimentos que utilizam radiação com animais e o objetivo era propor um Procedimento Operacional Padrão que refinasse os procedimentos realizados e a avaliação do bem-estar de animais nessa prática experimental.

Achei muito interessante e, ao mesmo tempo, fiquei muito honrada que elas viessem propor essa parceria, pois certamente viram em mim alguém que comunga dos mesmos ideais de amor e respeito aos animais e a priorização do bem-estar deles. Monique e Daiani possuem uma longa trajetória profissional em biotérios experimentais no Instituto Oswaldo Cruz da Fiocruz com reconhecida dedicação aos animais. Evidente que aceitei na hora.

Veio a pandemia, e os planos, como os de toda humanidade, tiveram que ser adaptados. Não foi mais possível continuar os experimentos em radiação em função do isolamento social e o foco das pesquisas na instituição agora estaria totalmente voltado para o enfrentamento da pandemia. Mas nós continuávamos preocupadas com o bem-estar dos animais e cada vez mais envolvidas com o tema, pois a pandemia só escancarou a importância do debate sobre ponto final humanitário aplicado não somente no decorrer de experimentos, mas sobretudo diante de emergências em saúde pública, como essa que vivenciamos. Foi, então, que percebemos que estávamos defronte da oportunidade de mergulhar no entendimento da percepção dos profissionais envolvidos em experimentação sobre o ponto final humanitário aplicado aos animais.

Daiani defendeu seu mestrado em 2022 já com Pedro nos braços, recém-chegado a esse planeta totalmente virado de cabeça para baixo, e um dos produtos resultantes, após nos depararmos com os resultados de sua dissertação, foi a ideia de organizarmos essa publicação na temática para contribuir com os profissionais de Ciência em Animais de Laboratório. A ideia foi abraçada de imediato pela Coordenação de Ensino do ICTB e apoiada pela nossa vice-diretoria de Ensino, Pesquisa e Inovação e Direção do ICTB.

Eu e Monique organizamos esta obra com muito carinho por ela e com a sorte de contarmos com excelentes profissionais e colegas que aceitaram produzi-la conosco, imbuídos de colaborar com nossos conhecimentos para a reflexão e a melhor prática possível do ponto final humanitário. A obra que apresentamos foi escrita com o objetivo de fornecer informações sobre a prática

do *endpoint* nos principais tipos de experimentos realizados com animais, sem deixar de lado informações igualmente relevantes como: a Cultura do Cuidado (a qual deve permear o tempo todo nossa relação com os animais e pessoas); o detalhamento da legislação que embasa a aplicação do momento do ponto final humanitário; a avaliação de dor e bem-estar, além de possíveis intervenções clínicas; a importância de uma eutanásia igualmente humanitária, bem como da manutenção de um bom controle de qualidade e segurança no experimentos; e, para finalizar, um sobrevoo sobre as inúmeras possibilidades que a tecnologia atualmente nos apresenta para apoiar a avaliação do bem-estar animal.

Longe da pretensão de ser um guia, na literalidade do seu significado, esperamos que a obra possa contribuir não só com conhecimento partilhado, mas, sobretudo, com o aprofundamento no debate e na atualização constante de publicações sobre o tema, os quais nos remeterão incessantemente à importância de não perdermos de vista o respeito aos animais.

Klena Sarges

SUMÁRIO

CONCEITOS GERAIS EM CIÊNCIA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO E FINALIZAÇÃO HUMANITÁRIA

Data de aceite: 03/07/2023

Daiani Cotrim de Paiva Campbell
Centro de Experimentação Animal, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz,
Rio de Janeiro/RJ
ORCID 0000-0003-0699-204X

1 | CONSIDERAÇÕES GERAIS

Há milhares de anos o ser humano, na sua incessante busca pelo conhecimento, utiliza animais em experimentação. E, durante muito tempo, esses animais foram relegados a um segundo plano dentro do contexto científico. Recentemente, percebeu-se a importância dos biomodelos e do bem-estar relacionados aos resultados dos experimentos e como isso reflete diretamente na qualidade da pesquisa. Assim, surgiu a Ciência em Animais de Laboratório, que estuda o animal que será utilizado nas pesquisas e quais as exigências que este necessita quanto à criação, manejo e experimentação (FRAJBLAT; AMARAL; RIVERA, 2008).

A Ciência em Animais de Laboratório é uma especialidade no campo da medicina veterinária, porém de caráter multidisciplinar, porque absorve os conhecimentos oriundos de inúmeras áreas, bem como serve de base para todas as outras ciências que utilizam biomodelos em seus trabalhos. Nesta ciência são desenvolvidas algumas atividades, tais como: o aprimoramento de biomodelos experimentais; elaboração e aplicação de metodologias que minimizem a dor, o desconforto e o distresse dos animais no curso da experimentação; a evolução de instalações, equipamentos e procedimentos voltados à criação, manutenção e experimentação animal e à promoção do conhecimento para a melhoria da qualidade de vida humana e animal (MATTARAIA; OLIVEIRA, 2012).

É evidente que a experimentação animal se apresenta como uma atividade de elevado comprometimento e com demasiado valor ético, justamente, devido à ainda necessária utilização dos animais nas pesquisas. Assim, a

finalização humanitária na Ciência em Animais de Laboratório, principalmente no âmbito da experimentação animal, quando realizada de forma apropriada e oportuna, pode ser considerada como uma estratégia de promoção do bem-estar animal. Além disso, os princípios éticos são os primeiros pilares da experimentação animal de excelência aliados à observância dos princípios dos 3Rs, que orientam ações com o objetivo de promover o bem-estar animal. E ambos sustentam que existe uma convergência entre a utilização humanitária de biomodelos e as pesquisas de alta qualidade. Portanto, o bem-estar dos biomodelos submetidos à experimentação está intrinsecamente associado à obtenção de resultados fidedignos, garantindo, assim, a robustez, a reprodutibilidade e a replicabilidade das pesquisas com animais. Deste modo, conhecer os conceitos e a relevância dos assuntos que serão abordados neste guia faz-se de suma importância para o entendimento desta temática que é a Finalização Humanitária na Ciência em Animais de Laboratório.

2 | ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

A utilização de biomodelos em ensaios biomédicos, também denominada de experimentação animal, é uma atividade de alta responsabilidade e profundo valor ético. As primeiras referências à experimentação animal encontram-se relatadas nos escritos de filósofos gregos alguns séculos antes da era cristã (MATTARAIA; OLIVEIRA, 2012). Logo, entende-se por experimentação quando um determinado procedimento é levado a efeito, visando descobrir princípio ou efeito desconhecido, pesquisar uma hipótese ou ilustrar um princípio ou fato conhecido. E, no caso da experimentação animal, refere-se aos procedimentos realizados em biomodelos (PAIXÃO, 2001).

A Ciência em Animais de Laboratório alcançou um considerável progresso nos últimos 30 anos no Brasil, sobretudo na experimentação animal, com o advento da Lei Arouca em 2008, o que suscitou novas questões relacionadas às necessidades dos animais que antes não eram consideradas. Os biomodelos que outrora eram considerados "meros reagentes" e que, inclusive, foram durante algum tempo tratados com desapreço, agora são dignos de preocupações morais e éticas (ANDRADE, 2002; MAGALHÃES, 2009; GUARALDO, 2017; RIVERA; RODRIGUES, 2009).

O universo da experimentação animal é bastante amplo e complexo, portanto, cada pesquisa que se utiliza da experimentação animal pode apontar para aspectos éticos distintos, mas diretamente relacionados àquela determinada conduta (PAIXÃO, 2001). Toda sociedade que preza pela ética e o bom senso deve se atentar para os cuidados e o uso de qualquer espécie viva, inclusive na experimentação animal. Todos aqueles que utilizam biomodelos, seja no ensino ou na pesquisa, devem valorizar a vida animal, considerando os biomodelos seres sencientes, buscando formas de reduzir ou eliminar a dor, o desconforto e o distresse e, sobretudo, assegurar que os cuidados e o manejo destinados aos biomodelos sejam sempre de excelente qualidade (MEZADRI; TOMÁZ;

AMARAL, 2004).

A ética é uma atitude cultural e crítica sobre valores e posições de relevância no momento de atuar. Atualmente, os seres humanos estão adotando um novo tipo de comportamento e de ética frente à utilização consciente dos recursos naturais. Assim, o ser humano tem uma representação significativa na filosofia moral, porque a ética é estabelecida pelo homem. E não se conhecem outras criaturas que sejam capazes de pensamentos tão abstratos, como as reflexões ou juízo de valores. Portanto, ser ético é a adoção prática de padrões de conduta estabelecidos em opções morais feitas segundo o entendimento de critérios racionais, com plena consciência e liberdade, e cujas consequências são assumidas com responsabilidade. Logo, a ética animal prescreve às pessoas, primordialmente, aquilo que não deve ser realizado. Além disso, a ética que se almeja na experimentação animal é aquela que traduza o entendimento sobre as questões éticas dos biomodelos e que se concretize na prática de ações (RIVERA; RODRIGUES, 2009).

A experimentação animal é justificada quando satisfaz a premissa de uma expectativa razoável de benefício imediato ou eventual para a sociedade ou para os animais. Além disso, deve-se garantir o cumprimento de alguns critérios, tais como: fornecer cuidados e manejos humanitários aos biomodelos; evitar ou minimizar a dor, o desconforto e o distresse; fazer o uso racional dos biomodelos; conhecer as particularidades dos biomodelos, entre outros. Assim, a legislação em vigor deve proteger tanto os biomodelos quanto os profissionais que trabalham com estes. Conforme as diretrizes preconizadas nos guias internacionais, as pesquisas com experimentação animal devem seguir os seguintes propósitos: ampliar o conhecimento dos processos envolvidos no estudo, bem como o entendimento do funcionamento das espécies; determinar previamente a reprodutibilidade e replicabilidade da pesquisa; fornecer resultados que beneficiem a saúde e o bem-estar humano e animal (GUIMARÃES; MÁZARO *et al.*, 2004).

Logo, a ética é o estudo dos padrões de conduta humana no que se refere ao bem e ao mal, de modo relativo e de modo absoluto. Já a moral é um conjunto de regras de conduta consideradas como válidas, tanto de modo absoluto, ou seja, para qualquer tempo ou lugar, como para grupos ou pessoas determinadas, ou seja, conforme a cultura. O princípio ético de reverência pela vida exige que os seres humanos protejam os animais (RIVERA, 1996). Deste modo, realizar uma pesquisa, sobretudo, utilizando a experimentação animal é uma tarefa bastante difícil, além de requerer conhecimento técnico adequado e alto rigor ético, sem os quais seriam cometidos danos irreparáveis aos biomodelos. Diante disso, as divergências éticas que envolvem a experimentação animal surgem do conflito entre as justificativas para o uso de animais em benefício para a sociedade e o ato de não causar dor, desconforto e distresse. Portanto, são consideradas pesquisas éticas aquelas que resultem em benefício direto para a saúde humana e animal ou que contribuam significativamente com mais conhecimentos (GUIMARÃES; MÁZARO *et al.*, 2004).

A utilização de biomodelos em ensino ou pesquisa é um privilégio. Esses animais estão ajudando a desvendar os mistérios da ciência e merecem respeito e cuidados de excelência. Os cuidados, manejo e utilização acertados dos biomodelos proporcionam resultados científicos mais robustos e fidedignos, o que impacta diretamente na reprodutibilidade e replicabilidade das pesquisas.

3 | FINALIZAÇÃO HUMANITÁRIA

Os estudos experimentais podem envolver procedimentos que necessitem da observação de sinais clínicos ou morbidade nos animais a partir de uma infecção ou de uma lesão induzida (NUNAMAKER *et al.*, 2013). Para evitar essas situações, a finalização humanitária ou *humane endpoints* é o momento no qual o encerramento do uso do animal na experimentação é antecipado para que a dor, o desconforto e o distresse sejam prevenidos, interrompidos ou aliviados mediante algumas ações (LAPCHIK *et al.*, 2017). Para tanto, utilizam-se critérios predeterminados para avaliar quando e como deve ser realizada a finalização humanitária.

As ações que podem ser tomadas no momento de decisão para a execução da finalização humanitária são: a adoção de medidas de intervenção para alívio da dor, desconforto ou distresse; a interrupção de um procedimento doloroso; a exclusão do animal do estudo; e o óbito humanitário do animal (CONCEA, 2015). Quanto aos critérios predeterminados utilizados como indicadores preditivos de morte iminente e para a realização da finalização humanitária, pode-se observar os parâmetros clínicos e/ou fisiológicos; os parâmetros comportamentais e/ou etológicos; e os marcadores bioquímicos e/ou moleculares (MORTON, 2000; LITTIN *et al.*, 2008).

São objetivos da finalização humanitária: evitar o óbito do animal sozinho na gaiola, que geralmente ocorre por diversos fatores nem sempre intrínsecos ao protocolo experimental, porém esse óbito é utilizado como o desfecho mais provável do projeto de pesquisa. Ou mesmo que o animal atinja o estágio considerado “moribundo” durante o curso da experimentação. Além disso, as intervenções e assistências médico-veterinárias são cruciais na promoção do bem-estar e na garantia da qualidade de vida dos biomodelos neste ínterim da experimentação (TOTH, 2000).

Portanto, os benefícios da aplicação acertada da finalização humanitária na experimentação animal são inúmeros, tais como: promoção do bem-estar animal; melhoria das habilidades e competências das equipes laborais; aplicabilidade dos princípios dos 3Rs; resultados experimentais mais robustos e fidedignos; incremento da reprodutibilidade e replicabilidade nas pesquisas.

4 | PRINCÍPIOS DOS 3RS

A utilização de biomodelos para as finalidades de ensino e pesquisa cada vez mais tem sido motivo de controvérsia, com preocupações levantadas sobre a senciência dos animais e, sobretudo, os danos causados a estes, que, na maioria das vezes, são significativos. Em 1959, através de iniciativas da Federação das Universidades para o Bem-Estar Animal (UFAW), dois cientistas ingleses, Willian M. S Russel e Rex L. Burch, formularam os Princípios Humanitários da Experimentação Animal, cujo objetivo principal é a promoção do bem-estar dos animais através de ações que podem reduzir ou eliminar os danos (dor, desconforto e distresse). No livro *The Principles of Humane Experimental Technique*, foi possível sintetizar com três palavras (*reduction, refinement*, e *replacement*) a definição de que o uso humanitário de animais de laboratório na experimentação animal está correlacionado com a excelência das pesquisas (HUBRECHT; CARTER, 2019).

A obra de Russel e Burch tornou-se um legado para a experimentação animal, visto que os princípios dos 3Rs transformaram-se em medidas para melhorar o bem-estar dos biomodelos utilizados em pesquisas, e agora são empregados como uma estrutura ética para todos aqueles que se dedicam à ciência em animais de laboratório no mundo. Os termos introduzidos por Russel e Burch são conhecidos e definidos como: redução, refinamento e substituição. E contribuem sobremaneira para a realização de procedimentos humanitários envolvendo os biomodelos na experimentação (MAJEROWICZ, 2008).

Os princípios dos 3Rs se constituem em:

- *Replacement* – traduzido como substituição, refere-se aos métodos alternativos que utilizam organismos com sensibilidade limitada ou metodologias com material insensível, como, por exemplo, cultivos celulares, uso de órgãos ou microrganismos, testes *in vitro*, modelos matemáticos e computacionais, entre outros.

- *Reduction* – traduzido como redução, refere-se aos esforços dedicados para o uso racional dos biomodelos, seja através da limitação ao uso de animais ou a diminuição do número de animais utilizados, mas que forneça resultados estatísticos significativos, evitando repetições desnecessárias. Para tanto, é fundamental o planejamento da pesquisa com o uso de ferramentas específicas para o delineamento experimental e análise prévia do número amostral mediante métodos estatísticos.

- *Refinement* – traduzido como refinamento, refere-se aos métodos que visam eliminar ou minimizar a dor, o desconforto e o distresse dos biomodelos. O aprimoramento de procedimentos operacionais padronizados, a utilização de procedimentos experimentais menos invasivos, o uso de ações mitigadoras para danos, seja com medidas de intervenção ou assistência médico-veterinária, e o desenvolvimento de manejo humanitário são exemplos de refinamento.

Deste modo, Russel e Burch descreveram nesta ordem, destacando a ordem em que devem ser abordados os termos, assim: animais sencientes não devem ser utilizados se

alternativas não sencientes estiverem disponíveis; se os animais tiverem que ser utilizados, então o delineamento e a análise do projeto devem ser tais que o número de animais sencientes seja compatível com o alcance dos objetivos da pesquisa; e que medidas apropriadas devem ser tomadas para mitigar quaisquer dores, desconforto ou distresse que os animais possam sentir (TANNENBAUM; BENNETT, 2015).

Logo, o impacto positivo que os princípios dos 3Rs têm no bem-estar dos animais utilizados na experimentação tem influência direta nas pesquisas. Além disso, os princípios são internacionalmente aceitos como uma estrutura ética sob a qual a experimentação deve ser conduzida. Portanto, no contexto do refinamento de protocolos experimentais e considerando os princípios dos 3Rs, a determinação da finalização humanitária é cientificamente justificada para que a dor, o desconforto e o distresse dos biomodelos possam ser prevenidos, rescindidos ou aliviados, atendendo aos objetivos científicos das pesquisas.

5 | REPRODUTIBILIDADE NA PESQUISA COM ANIMAIS

A crise mundial de reprodutibilidade e replicabilidade é uma crise metodológica contínua, na qual se constatou que muitos estudos científicos são difíceis ou impossíveis de serem reproduzidos ou replicados. Essa preocupação tomou repercussão em meados de 2010 como parte de uma crescente consciência do problema - a crise afeta severamente as ciências biomédicas, as ciências naturais e as ciências sociais. Assim, representa um importante campo de pesquisa na área da metaciência. Portanto, considerações sobre os fatores que originam essa problemática, assim como as medidas resolutivas, são objetivos do escopo da metaciência (JÚNIOR, 2018).

A reprodutibilidade e a replicabilidade dos resultados experimentais, sobretudo na experimentação animal, são uma parte essencial do método científico, deste modo, a incapacidade de reproduzir ou replicar pesquisas de outros cientistas tem consequências potencialmente graves para inúmeros campos da ciência, e, justamente, nos quais as teorias significativas são baseadas em procedimentos experimentais irreprodutíveis. Atualmente, a comunidade científica mundial empreende esforços para reinvestigar os resultados ditos clássicos, para determinar a confiabilidade dos resultados, e, caso não sejam confiáveis, compreender as razões que resultaram nas falhas de reprodução e/ou replicação (BEGLEY, 2013).

Alguns fatores contribuem para a crise de reprodutibilidade e replicabilidade das pesquisas, inclusive na experimentação animal, e são: delineamento experimental inadequado, falta de randomização de grupos experimentais, não realização de experimentos de forma cega, problemas na análise estatística, seleção inadequada de dados, outliers e resultados manipulados, falta de réplicas e tréplicas dos experimentos, não uso de controles positivos e negativos, uso de reagentes, equipamentos e métodos não

validados ou certificados, testes estatísticos inapropriados, além da má conduta científica com fabricação ou falsificação de dados (IOANNIDIS, 2005).

No entanto, a maneira pela qual as pesquisas são incentivadas pode ser o cerne da crise. Os objetivos tanto das instituições de pesquisa quanto dos pesquisadores é obter financiamento para as pesquisas, realizar a publicação dos resultados e conclusões em revistas de alto impacto, e conseguir elevado prestígio junto à comunidade científica. Porém, a própria comunidade científica não reconhece o incentivo perverso que essa produtividade científica exacerbada, pressionada por eficiência e eficácia, cria.

Assim, a crise mundial de reprodutibilidade e replicabilidade observada nas pesquisas científicas com experimentação animal demonstra o desperdício com recursos financeiros, de tempo, de vidas animais e humanas e, principalmente, na chance de contribuir para o progresso da ciência. Geralmente, as pesquisas apresentam baixo grau de robustez, de reprodutibilidade e replicabilidade, como foi exposto num estudo recente realizado no Brasil (JÚNIOR, 2018). Cada vez mais, a importância do planejamento e da execução dispensada tanto nos cuidados dos animais quanto nos procedimentos experimentais é evidenciada e diretamente relacionada com a qualidade das pesquisas. Portanto, com a finalidade de redução dos custos operacionais e o estabelecimento para a garantia do padrão de excelência nas pesquisas, é fundamental que as medidas resolutivas dessa problemática sejam determinadas.

Logo, as medidas resolutivas para a crise de reprodutibilidade e replicabilidade são: incentivo à política de integridade científica; emprego de relatórios parciais contendo a descrição da metodologia, possíveis alterações quando pertinentes e com os resultados prévios; incentivo à utilização de ferramentas para delineamento experimental e guias para orientação das atividades relacionadas à pesquisa; publicação dos resultados e conclusões em repositórios cuja política seja de ciência aberta e transparência; uso de métodos e análises estatísticas adequados; estímulo aos estudos cegos, duplo-cegos e randomização; publicação de dados completos, sobretudo, os negativos; salientar a importância dos dados negativos nas pesquisas que utilizam experimentação animal; uso de plataformas para a notificação de incidentes. Essas ações contribuem para a robustez, rastreabilidade, transparência, reprodutibilidade e replicabilidade das pesquisas, além de garantir que as publicações científicas sejam sustentadas sob o escrutínio dos pares. O que também contribui sobremaneira para a observância aos princípios dos 3Rs (BEGLEY, 2013).

As pesquisas que utilizam biomodelos necessitam de atenção especial por parte dos pesquisadores, porque os animais submetidos à experimentação podem apresentar algumas variações de difícil controle. Essas variações podem ser relacionadas com as características dos biomodelos: quanto à qualidade sanitária e genética dos biomodelos; quanto às particularidades das instalações e seus controles ambientais; devido à incompatibilidade de protocolos experimentais; registros dos procedimentos incompletos

ou ausentes; particularidades relativas ao manejo e cuidados destinados aos biomodelos. Portanto, é imprescindível que as medidas resolutivas para a crise sejam colocadas em ação. Além disso, os pesquisadores podem implementar recursos como a rastreabilidade das informações através do uso de registros dos procedimentos, bem como a compreensão sobre as particularidades de cada biomodelo.

A reprodutibilidade e a replicabilidade das pesquisas apresentam maior probabilidade de ocorrer quando as informações contidas nos documentos são suficientemente adequadas, objetivas e completas, para que, assim, outros cientistas consigam conduzir os procedimentos experimentais de forma semelhante à pesquisa original, e obtenham resultados semelhantes. Mesmo que alguns pontos da metodologia sejam diferentes, os resultados devem ser próximos. Ademais, não existe o incentivo à publicação de resultados considerados negativos, no entanto, estes são de grande relevância para o avanço científico. Porque a divulgação desses resultados pode evitar que outros cientistas realizem pesquisas desnecessárias, envolvendo o desperdício de recursos financeiros e humanos, de tempo dedicado em pesquisa e das vidas dos biomodelos (BEGLEY; IOANNIDIS, 2015).

Pode-se concluir que os resultados das pesquisas têm intrínseca relação com o planejamento e a realização dos cuidados e procedimentos experimentais na utilização de biomodelos. A implantação das medidas resolutivas para a crise de reprodutibilidade e replicabilidade, aliada a uma forte política institucional de integridade científica, contribuirá para o incremento na qualidade das pesquisas.

6 | BEM-ESTAR ANIMAL

O bem-estar animal tornou-se uma importante área de estudo, sobretudo, quando inserida na Ciência em Animais de Laboratório e no âmbito da experimentação. Essa transformação foi proporcionada pela evolução da ciência aliada aos constantes questionamentos sobre a utilização de biomodelos nas pesquisas científicas. A necessidade de regulamentação do uso de animais na experimentação e a pressão exercida pela sociedade civil suscitaram uma mudança de paradigma. E, assim, as relações entre o ser humano e os animais sofreram profundas alterações (FRAJBLAT; AMARAL; RIVERA, 2008).

A Ciência em Animais de Laboratório considera o bem-estar animal como um dos principais fatores que podem influenciar diretamente nos resultados das pesquisas, e, portanto, valoriza o uso ético dos biomodelos enfatizando os princípios dos 3Rs. Logo, o termo bem-estar poderá apresentar inúmeras interpretações em relação à sua concepção e, inclusive, de acordo com as características intrínsecas das diversas espécies de biomodelos, além de situações e particularidades afins (FRAJBLAT; AMARAL; RIVERA, 2008).

É sabido que o bem-estar animal é um assunto complexo e multifacetado com

dimensões científicas, éticas, econômicas, culturais, sociais, religiosas e políticas. Assunto este que sempre atrai o interesse da sociedade civil, portanto, é considerado prioridade em nível internacional. A legislação brasileira, assim como as diretrizes preconizadas nos guias internacionais, versa sobre o tema, enfatizando os cuidados que devam ser dedicados aos animais utilizados em pesquisas (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH/ TERRESTRIAL ANIMAL HEALTH CODE, 2021).

Durante o período da evolução dessa área de estudo que se tornou o bem-estar animal, inúmeras foram as tentativas de alguns autores em conceituar esse termo. Atualmente, o conceito mais abrangente e completo é o seguinte:

O bem-estar é compreendido em três componentes, a saber: quando a fisiologia e a anatomia do organismo em questão não estão comprometidas; um estado completo de bem-estar físico, mental e social; e com a íntegra capacidade de realizar seu repertório comportamental inato ou as adaptações específicas para a espécie (GUIMARÃES; MÁZARO *et al.*, 2004).

Geralmente, nas pesquisas científicas verifica-se algum grau de desconforto imposto aos animais para se atingir os objetivos científicos, mas, em todos os casos, esforços devem ser feitos para minimizar os prováveis danos, visto que animais com seu bem-estar comprometido têm comportamento, fisiologia e imunologia alterados, levando a conclusões não confiáveis ou variação indesejada na produção científica, afetando a confiabilidade, a reprodutibilidade e a replicabilidade do estudo (POOLE, 1999).

Portanto, os regulamentos relacionados ao bem-estar dos animais exigem que os procedimentos nos quais estes estejam envolvidos sejam projetados com a finalidade de evitar ou minimizar a dor, o desconforto e o distresse. Igualmente, que sejam descritas as ações mitigadoras dos potenciais danos através de intervenções mediante a assistência médico-veterinária. Deste modo, a aplicação acertada do ponto final humanitário colabora para a melhoria do bem-estar dos animais submetidos à experimentação. Assim, a finalização humanitária é sempre a opção mais ponderada e aceita, tendo em vista a manutenção do bem-estar animal (BRASIL, CONCEA, RN n° 25, 2015).

Sabe-se que os biomodelos que estão sob os cuidados de seres humanos e submetidos à experimentação vivenciam uma variedade de fatores que podem afetar o seu bem-estar. Esses fatores incluem o microambiente e o macroambiente, as interações intraespecíficas e interespecíficas, além do repertório comportamental inato ou adaptativo. Ademais, a compreensão de que os biomodelos são animais dotados de senciência é outro fator determinante para o êxito das pesquisas. Desta forma, senciência é a capacidade de sentir, percepcionar ou experienciar estados emocionais tanto positivos quanto negativos, além da consciência do ambiente e a capacidade para fazer escolhas.

Mas proporcionar bem-estar aos biomodelos submetidos à experimentação não é uma tarefa simples. Para o entendimento sobre as particularidades do bem-estar animal, ainda é necessário: determinar os fatores que influenciam o bem-estar; reconhecer

os aspectos relacionados à fisiologia, ao comportamento, ao psicológico e ao social; mensurar o bem-estar de forma objetiva e mediante prévia validação; e avaliar as ações voltadas à promoção do bem-estar. Finalmente, verifica-se que todos esses elementos podem influenciar o bem-estar dos biomodelos numa escala contínua e variável entre bem-estar negativo, neutro ou positivo. E, portanto, a partir desse conhecimento adquirido, é concebida uma série de obrigações éticas que certamente favorecerão a qualidade de vida dos biomodelos, inclusive, quando da implantação de ações voltadas à promoção do bem-estar.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, A. O Bioterismo: evolução e importância. *In*: ANDRADE, A; PINTO, S. C; OLIVEIRA, R. S. (org.). **Animais de Laboratório:** criação e experimentação. P. 19-22. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002.

BRASIL. CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA. **Resolução Normativa n° 25, de 29 de setembro de 2015**. Baixa o capítulo "Introdução Geral" do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais para Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. 2015.

BEGLEY, C. Six red flags for suspect work. **Nature**, v. 497, p. 433–434, 2013.

BEGLEY, C. G.; IOANNIDIS, J. P. Reproducibility in Science: Improving the Standard for Basic and Preclinical Research. **Circulation Research**, v. 116, p. 116–126, 2015.

FRAJBLAT, M.; AMARAL, V. L. L.; RIVERA, E. A. B. Ciência em animais de laboratório. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, p. 44-46, 2008.

GUARALDO, A. M. A. Prefácio. In: LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. M.; KO, G. M. (org.). Cuidados e manejo de animais de laboratório. 2 ed. Rio de Janeiro: Atheneu Editora, 2017. 733 p.

GUIMARÃES, M. A; MÁZARO, R. (col.). ANDERSEN, M. L.; D' ALMEIDA, V.; KO, G. M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P. J. F.; MAGALHÃES, L. E.; TUFIK, S. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo, 2004.

HUBRECHT, R. C.; Carter, E. The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change. **Animals** (Basel), 2019.

HUBRECHT, R. C.; CARTER, E. The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change. **Animals** (Basel), v. 9, n. 10, 2019.

IOANNIDIS, J. P. A. Why Most Published Research Findings Are False. **PLOS Medicine**, v. 2, 2005.

JÚNIOR, E. R. **Uma análise crítica sobre a confiabilidade, Rastreabilidade e reprodutibilidade dos estudos não clínicos desenvolvidos no Brasil nas áreas biomédicas e publicados em revistas científicas nacionais e internacionais**. Dissertação (Mestrado Profissional) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2018. 141 p.

LAPCHIK, V. V.; MATTARAIA, V. M.; KO, G. M. **Cuidados e Manejo de animais de laboratório**. Rio de Janeiro: Atheneu Editora, 2017.

LITTIN, K.; ACEVEDO, A.; BROWNE, W.; EDGAR, J.; MENDL, M.; OWEN, D.; SHERWIN, C.; WÜRBEL, H.; NICOL, C. (2008). Towards humane end points: behavioural changes precede clinical signs of disease in a Huntington's disease model. Proceedings of the Royal Society B: **Biological Sciences**, v. 275, n. 1645, p. 1865-1874, 2008.

MAGALHÃES, L. E. Evolução da Ciência de Animais de Laboratório. *In*: LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. M.; KO, G. M. (org.). **Cuidados e manejos de animais de laboratório**. São Paulo: Atheneu Editora, 2009, 708 p.

MAJEROWICZ, J. Boas práticas em biotérios e biossegurança. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

MATTARAIA, V. G. M; OLIVEIRA, G. M. Introdução. *In:* MATTARAIA, V. G. M; OLIVEIRA, G. M. **Comportamento de camundongos em biotério**. P. 17-30. São Paulo: SBCAL, 2012.

MEZADRI, T. J.; TOMÁZ, V. A.; AMARAL, V. L. L. **Animais de laboratório**: cuidados na iniciação experimental. Florianópolis: Editora UFSC, 2004, 155 p.

MCINTOSH, R. D.; CHAMBERS, C. D. The three R's of scientific integrity: Replicability, reproducibility, and robustness. **Cortex**, v. 129, p.4-7, 2020.

MORTON, David B. A systematic approach for establishing humane endpoints. **ILAR Journal**, v. 41, n. 2, p. 80-86, 2000.

NUNAMAKER, E. A.; ANDERSON, R. J.; ARTWOHL, J. E.; LYUBIMOV, A.V.; FORTMAN, J. D. Predictive observation-based endpoint criteria for mice receiving total body irradiation. **Comparative Medicine**, v. 63, n. 4, p. 313-322, 2013.

PAIXÃO, R. L. **Experimentação animal**: razões e emoções para uma ética. 2001. 189 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2001.

POOLE, T. UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals. **Blackwell Science**, v. 1, n. 7, p. 97-134, 1999.

RIVERA, E. B.; RODRIGUES, U. B. **Ética na utilização de modelos animais**. *In*: LAPCHIK, V. V.; MATTARAIA, V. M.; KO, G. M. São Paulo: Atheneu Editora, 2009.

RIVERA, E. Ética, bem-estar e legislação. *In*: DE LUCA, R. R.; ALEXANDRE, S. R.; MARQUES, T.; SOUZA, N. L.; MERUSSE, J. L. B.; NEVES, S. P. **Manual para técnicos em bioterismo**. São Paulo: Winner Graph, 1996.

TANNENBAUM, J.; BENNETT, B. T. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. **Journal of the American Association for Laboratory Animals Science**, v. 54, n.2, p.120-32, 2015.

TOTH, L. A. Defining the moribund condition as an experimental endpoint for animal research. **ILAR Journal**, v. 41, n. 2, p. 72-79, 2000.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH – WOAH/OIE. **Terrestrial Animal Health Code Online Access**. Section 7: Animal Welfare. Chapter 7.8: Use of Animals in Research and Education. WOAH/OIE, p. 1-12, 2021.

CAPÍTULO 2

A CULTURA DO CUIDADO

Data de aceite: 03/07/2023

Cleide Falcone
Pesquisadora Independente e Consultora na área de Comportamento, Bem-Estar Animal e Implementação dos 3Rs
ORCID 0000-0003-0400-217X

Daiani Cotrim de Paiva Campbell
Centro de Experimentação Animal, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro/RJ
ORCID 0000-0003-0699-204X

Klena Sarges Marruaz da Silva
Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos/Fundação Oswaldo Cruz (ICTB/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ
ORCID 0000-0002-5996-490X

Monique Ribeiro de Lima
Centro de Experimentação Animal, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz,
Rio de Janeiro/RJ
ORCID 0009-0008-8745-9522

1 | INTRODUÇÃO

O uso de animais em ensino e pesquisa contribuiu significativamente para a descoberta da cura de muitas doenças tanto em humanos, como em animais. Embora o grande avanço da tecnologia nas últimas décadas tenha proporcionado a criação de modelos alternativos, juntamente com a pressão da sociedade para que o uso de animais no ensino e pesquisa seja substituído por modelos alternativos, ainda continua sendo necessário o uso do modelo animal para o contínuo desenvolvimento da ciência (DIRETIVA, 2010/63/UE). Considerando que a comunidade científica está ciente de que a qualidade dos dados obtidos através de estudos conduzidos com o uso dos animais está diretamente ligada à qualidade dos cuidados com os animais (POOLE, 1997), e que a maioria das pesquisas realizadas com animais é custeada com recursos públicos, mostra-se a necessidade de assumirmos responsabilidade científica e ética e implementarmos programas com padrões excelentes de monitoramento da saúde dos animais usados em ensino e pesquisa.

A preocupação com os cuidados com o bem-estar dos animais deu-se início

no século XIX quando, em 1823, Jeremy Bentham mencionou que os animais podiam sofrer, sentir dor e desconforto (DUNCAN, 2019). Também durante o século XIX, foi criada na Inglaterra a Lei "On the Cruelty to Animals Act" (RIVERA, 2002), mas somente no final do século XX os movimentos em defesa dos animais se fortaleceram com a publicação do livro "Animal Machine", escrito por Ruth Harrison (DUNCAN, 2019).

Na esteira do desenvolvimento da Ciência em Animais de Laboratório (CAL), o bem-estar dos animais tem sido bastante discutido. Embora o papel dos profissionais que trabalham com animais usados para fins de ensino e pesquisa tenha sido fundamental para preconizar o bem-estar dos animais (AALAS, 2001; MEDINA, 2008), somente a partir da primeira década do século XXI foi dada atenção para os cuidados aos profissionais que cuidam dos animais, denominada Cultura do Cuidado (WILLIAMS, 2021). Williams discute no seu artigo a importância da implementação de programas que preconizam tanto o bem-estar dos animais, como dos profissionais que trabalham com animais destinados ao ensino e à pesquisa. Vale ressaltar que os programas voltados ao bem-estar animal, além de melhorarem a qualidade de vida dos animais, impactam positivamente na qualidade dos resultados das pesquisas e na vida das pessoas e dos animais que se beneficiam dessas pesquisas (BROWN, 2013).

Neste capítulo, será abordada a importância da implementação da Cultura do Cuidado em instituições que usam o modelo animal para ensino e pesquisa e mencionadas sugestões de como esta cultura pode ser incorporada na rotina dos profissionais que trabalham com animais.

2 | CULTURA DO CUIDADO – O QUE É

A Cultura do Cuidado visa promover melhoria contínua com alto padrão nos cuidados com os animais e com os profissionais que trabalham com os animais (BISCHOFF, 2021). Alguns autores discutem que a adoção de comportamentos e valores dentro de uma instituição têm impacto na produtividade e no desempenho dos colaboradores (SIMONE, 2009; NG'ANG´A e NYONGESA, 2012; UDDIN *et al.*, 2013).

A implementação de uma Cultura do Cuidado institucional requer um programa que envolva a equipe institucional composta pela administração, pesquisadores, profissionais que trabalham com os animais, comissões de ética e saúde ocupacional, bem como os responsáveis pela segurança e planejamento das instalações físicas e a comunidade em geral (local, regional, nacional e internacional). Implementar a Cultura de Cuidado significa seguir a legislação local, assim como se esforçar para seguir diretrizes, muitas vezes internacionais, como o *Guide to the Care and Use of Laboratory Animals*, que incentivam o monitoramento da saúde e bem-estar dos animais com alto padrão e, consequentemente, contribuem para obtenção de resultados científicos de alta qualidade (MEDINA, 2008). A Cultura do Cuidado também promove nas instituições a integridade no local de trabalho

com tomadas de decisões baseadas na ética, boa comunicação entre os colaboradores, contratação e retenção de profissionais treinados e bem qualificados e um ambiente que incentiva o desenvolvimento e melhoria contínua das atividades desenvolvidas (KLEIN e BAINE, 2007).

A implantação dessa cultura de cuidados requer altos padrões de competência, fornecidos através da experiência da equipe laboral no desenvolvimento de suas atividades e na promoção da educação continuada em CAL, com a execução de treinamentos constantes e incentivo à inovação contínua. Reuniões de equipes, palestras, cursos, treinamentos individuais direcionados, oficinas que ensinem o cálculo do tamanho de amostra e o delineamento experimental, palestras com desafios de CAL, "dia da CAL" (que é um evento para docentes, pesquisadores e discentes com palestras realizadas pela equipe que trabalha nos biotérios), são todas iniciativas que promovem a integração entre as diversas equipes de trabalho, a capacitação contínua e a valorização dos profissionais (BISCHOFF, 2021).

Além da educação continuada, faz parte da Cultura do Cuidado a manutenção do conhecimento atualizado das leis, dos regulamentos, das regras e práticas institucionais e cumprimento destas com a realização de avaliações periódicas, seja através de autoavaliação ou outras metodologias. A cooperação e a responsabilidade com o bem-estar dos animais devem ser compartilhadas por todas as pessoas envolvidas nas atividades que os utilizam. Cada pessoa precisa saber exatamente quais são os seus deveres e responsabilidades de forma inequívoca (BISCHOFF, 2021).

A Cultura do Cuidado também se refere ao cuidado com os humanos que trabalham diretamente com os animais de laboratório. É importante que a gestão institucional promova, ativamente, uma atmosfera laboral desprovida de medo e intimidação, garantindo que todos possam se expressar, abordando assuntos considerados problemáticos – compreendendo todos os lados – na tentativa de buscar a resolução de problemas e não em atribuir culpabilidade, e, desta forma, preconizando o bem-estar de forma geral, isto é, tantos dos animais, como dos profissionais que trabalham com os animais. A instituição deve garantir um ambiente de trabalho seguro, onde as pessoas possam ter o direito assegurado de questionar, indagar, sobretudo acionar as instâncias de controle e fiscalização por meio de denúncias anônimas. Deve-se propiciar o trabalho com transparência, não apenas somente discursar sobre ética e transparência na CAL. Um ambiente que permita ampla comunicação, apoio, pensamento em um legado, reconhecimento do trabalho e celebração das conquistas é fundamental para que a Cultura do Cuidado com os animais seja consolidada. É primordial o respeito, apoio ativo e atenção aos técnicos que manejam animais, aos médicos veterinários e a todo corpo técnico da instalação animal (BISCHOFF, 2021; ROBINSON; WILKINSON, 2022).

Igualmente importante é a necessidade de aceitar que os humanos que trabalham com animais podem errar, pois o erro é inevitável. Desta forma, a correção dos erros

de processos em instalações animais de pesquisa deve ser sempre realizada de forma educativa, evitando manter uma cultura punitiva, uma vez que esta não contribui para a resolução dos problemas e nem para o engajamento da equipe. Aplicar os programas institucionais de gestão de qualidade que garantem treinamento, competência e estruturas escritas para processos (como, por exemplo, os procedimentos operacionais padrão - POPs) é, também, uma forma de minimizar o potencial de erro (ROBINSON *et al*., 2021).

Pensando em minimizar erros, grupos de pesquisadores e técnicos que trabalham com animais utilizados em pesquisas, como a equipe de trabalho da Unidade de Bem-Estar Animal, do Hospital Universitário de Jena, na Alemanha, desenvolveram o CIRS-LAS (Critical Incident Reporting System - Laboratory Animal Science), que é uma plataforma do sistema de notificação de incidentes críticos em animais de laboratório. Nessa plataforma, qualquer pessoa que trabalha com ensino e/ou pesquisa que utiliza animais pode se cadastrar e buscar informações sobre acidentes reportados na experimentação animal para que, por meio do conhecimento destes, não haja repetição dos mesmos erros. A plataforma também mostra dicas para a implementação de 3Rs e informações sobre formas facilitadoras de promover o trabalho com transparência na CAL (BISCHOFF *et al*., 2018).

Alguns exemplos de incidentes que já foram notificados via plataforma e que podem ser acessados e visualizados são: os efeitos colaterais após a injeção de Tramadol e Paracetamol no uso combinado em camundongos; as altas taxas de mortalidade descritas para o tratamento com bortezomibe (medicamento de referência indicado para testes de novo tratamento antitumoral, destinado a pacientes com mieloma múltiplo, impossibilitados de receber tratamento com alta dose de quimioterapia ou transplante de medula óssea); danos renais em camundongos mantidos em colchão térmico após cirurgia, dentre outros (BISCHOFF *et al*., 2018).

3 | A CULTURA DO CUIDADO NO MUNDO

Nas instituições certificadas pelo *Canadian Council on Animal Care* (CCAC), a ciência baseada em animais só é aceitável caso a instituição comprometa-se em contribuir para a compreensão dos princípios biológicos fundamentais, ou para o desenvolvimento de conhecimentos que possam beneficiar humanos e/ou animais, ou seja, o equilíbrio ético que pondera sobre as pesquisas desenvolvidas não tem somente sua justificativa e diligência pautada pela saúde e vida humana, não é uma visão antropocêntrica. As diretrizes do CCAC estabelecem os requisitos básicos para cada programa institucional dentro de um sistema de supervisão de ética e cuidado animal, isto é, o Canadá dispõe de um sistema próprio destinado à ética e ao cuidado, estabelecendo, fortemente, as diretrizes da Cultura do Cuidado, possuindo um sistema próprio para essa cultura com os animais de laboratório (CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE, 2021; OLFERT, 1993).

Outros pré-requisitos ditados pelo CCAC que devem ser incluídos, já de antemão,

no projeto de pesquisa e que são de responsabilidade de todos os envolvidos nos trabalhos com animais são: delinear pesquisas com foco na substituição, redução e refinamento, promovendo uma aplicação direta dos princípios dos 3Rs; descrição detalhada do fornecimento de cuidados extras durante estudos complexos; discorrer sobre procedimentos para a promoção do bem-estar dos animais e apresentar parâmetros observáveis que possam ser mensuráveis para o estabelecimento de ponto final humanitário ou assistência veterinária quando necessário (CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE, 1998).

O *New Zealand National Animal Ethics Advisory Committee* (NAEAC – Comitê Consultivo Nacional de Ética Animal da Nova Zelândia, 2002) definiu a Cultura do Cuidado como um dever pessoal de cuidado, que:

> Envolve mais do que o básico do cuidado com os animais. Envolve um compromisso genuíno com o bem-estar dos animais, um respeito pela contribuição que eles dão ao seu trabalho e um desejo de melhorar seu bem-estar além dos padrões mínimos: em suma, uma cultura de cuidado.

O NAEAC reconheceu que na Ciência em Animais de Laboratório, assim como em qualquer área das ciências, é importante manter o dinamismo, ressaltando que as expectativas da sociedade em relação ao bem-estar animal estão em constante evolução, e que os profissionais envolvidos no cuidado dos animais devem manter-se continuamente atualizados sobre essas mudanças, amparando a melhoria constante na Cultura de Cuidado (OLFERT, 1993). O vínculo entre a responsabilidade pessoal pelo bem-estar animal e a capacidade de respostas às preocupações da sociedade civil tornou-se o centro de definições que foram demonstradas através da evolução das diretrizes e das legislações internacionais, sobretudo, aquelas ditadas pela União Europeia (DIRETIVA UNIÃO EUROPEIA, 2010).

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

A implementação da Cultura do Cuidado em uma instituição de pesquisa necessita da consciência de que praticá-la vai além do cumprimento da legislação aplicada ao uso de animais e que só funcionará com o comprometimento da sociedade e de toda comunidade envolvida no manejo e uso dos animais experimentais, desde os colaboradores que trabalham na instalação que produz os animais, até os pesquisadores que os utilizam.

O diálogo e a contínua discussão organizada sobre os padrões de excelência com os cuidados aos animais e aos profissionais que trabalham com os animais consolidam uma cultura organizacional que apoia e valoriza a ética, o comportamento atencioso e respeitoso com os animais e nas relações interpessoais, e preconiza resultados científicos de melhor qualidade.

REFERÊNCIAS

AALAS (American Association for Laboratory Animal Science). **Cost of caring**: Recognizing human emotions in the care of laboratory animals. Memphis, TN: AALAS. 2001.

BISCHOFF, S. CIRS-LAS - **Critical Incident Reporting System in Laboratory Animal Science** - Plataforma do sistema de notificação de incidentes críticos em animais de laboratório. Ministério Federal da Educação e Pesquisa da Alemanha. Apresentação da plataforma CIRS-LAS no evento "UNSUCK YOUR SCIENCE". Palestra online: Unsuck your Science, 2021 – Alemanha, 2021.

BISCHOFF, S.; TRIETSCHEL, D.; ENKELMANN, A.; SCHIFFNER, R.; ESTRADE, P.; KOBOLD, M. (2018) Learning from Negative Results-Critical Incident Reporting System in Laboratory Animal Science (CIRS-LAS.de). **J Anim Res Vet Sci**, v. 2, n. 9, p. 1-7, set. 2018.

BROWN, M. Ethics, and animal welfare. *In*: **Laboratory Animal Welfare**, ed. K. Bayne and P. Turner. New York: Elsevier, 7–14. 2013.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. **CCAC Guidelines on**: Choosing an appropriate endpoint in experiments using animals for research, teaching and testing. 1998.

DIRECTIVA 2010/63/UNIÃO EUROPEIA. Parlamento Europeu e do Conselho da União Europeia, de 22 de setembro de 2010. Relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos. Texto relevante para efeitos do Espaço Econômico Europeu. **Jornal Oficial da União Europeia**. 20 de out. 2010.

DUNCAN, I. J. H. **Animal Welfare**: A Brief History. Proceedings Animal Welfare: from Science to Law, 2019 - ISBN 978-2-9512167-4-7 [PDF].

GUIDE to the Care and Use of Laboratory Animals, 8th Edition. The National Academies Press: Washington, DC, 246 pp, 2011.

KLEIN, H. J.; BAYNE, K. A. Establishing a Culture of Care, Conscience, and Responsibility: Addressing the Improvement of Scientific Discovery and Animal Welfare Through Science-based Performance Standards. **ILAR Journal**, v. 48, n., 2007.

MEDINA, L. V. **Building a culture of animal welfare**: Past, present and future. ARBS Annu Rev Biomed Sci. São Paulo: São Paulo State University, Abbott Laboratories, 2008.

NG´ANG´A, M. J. e NYONGESA, W. J. The impact of organisational culture on performance of educational institutions. **Int J Bus Soc Sci3**(8): 211–217. 2012.

OLFERT, E. D.; CROSS, B. M.; MCWILLIAM, A. A. **Guide to the Care and Use of Experimental Animals**. Canadian Council on Animal Care, v.1, 2ª ed., 1993.

POOLE, T. Happy animals make good science. **Laboratory Animals**. v.31, n.2, p. 116-24, 1997.

RIVERA, E. A. B. Ética na Experimentação Animal. *In*: **Animais de Laboratório**: criação e experimentação [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. p. 25-28 ISBN: 85-7541-015-6. Disponível em: SciELO Books. Acesso em: 15 ago, 2020.

ROBINSON, S.; WHITE, W.; WILKES, J.; WILKINSON, C. Improving culture of care through maximising learning from observations and events: Addressing what is at fault. **Laboratory Animals**. v. 56, n. 2, p. 135-146, 2022.

ROBINSON, S.; WILKINSON, C. Maintaining a Culture of Care during a research animal facility closure. **Animal Technology and Welfare, Institute of Animal Technology Journal,** v. 21, n. 1, abr., 2022.

SIMONE, J. V. **Institutional culture**. Oncol Times 31(5): 5–6. 2009.

UDDIN, M. J.; LUVA, R. H. e HOSSIAN, S. M. M. **Impact of organizational culture on employee performance and productivity**: A case study of telecommunication sector in Bangladesh. Int J Bus Manag8(2): 63–77. 2013.

WILLIAMS, A. Caring for those who care: towards a more expansive understanding of 'cultures of care' in laboratory animal facilities. **Social & Cultural Geography**, p. 1-18, 2021.

FINALIZAÇÃO HUMANITÁRIA: LEGISLAÇÃO BRASILEIRA E A IMPORTÂNCIA DO ENSINO

Data de aceite: 03/07/2023

Maria Inês Doria Rossi
Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos –ICTB / Fiocruz – RJ – Rio de Janeiro –RJ
ORCID 0000-0002-3097-6755

André Secundino Abbagliato
Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos –ICTB / Fiocruz – RJ – Rio de Janeiro –RJ
ORCID 0000-0003-2728-6793

1 | INTRODUÇÃO

Há séculos, o homem utiliza animais em experimentos na busca do conhecimento científico e benefícios para a saúde de ambos. Porém, somente em 1909 houve a primeira publicação sobre aspectos éticos da utilização de animais em experimentação, proposta pela Associação Médica Americana. Em 1947, após a segunda Guerra Mundial, em virtude das atrocidades ocorridas contra civis e prisioneiros de guerra, incluindo experimentações com seres humanos, foi formulado o Código de Nuremberg, sendo este o primeiro documento internacional com um conjunto de normas éticas em pesquisa com seres humanos, no qual se estabeleceu que “o experimento deve ser baseado em resultados de experimentação em animais e no conhecimento da evolução da doença ou outros problemas em estudo; dessa maneira, os resultados já conhecidos justificam a realização do experimento”. Desta forma, justificou-se o uso de animais em pesquisas, porém, sem nenhuma norma ou diretriz legal regulamentada (REZENDE *et al*., 2008).

Em contrapartida a esse cenário de embate entre cientistas defensores da experimentação animal e os movimentos antiviviseccionistas, nome dado àqueles que se opõem à experimentação animal, o major Charles Hume, que era físico, escritor e ativista britânico do bem-estar animal, em 1926, fundou *University of London Animal Welfare Society* (ULAWS) que, em 1938, teve seu nome alterado para Federação das Universidades para o Bem-Estar Animal (*Universities Federation for Animal Welfare* -UFAW). Em 1947,

procurando embasar cientificamente o bem-estar animal, Hume e colaboradores publicaram a primeira edição da UFAW - *Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals* (RIVERA, 2002). Posteriormente, em 1954, Hume indicou o zoologista William M.S. Russell e o microbiologista Rex L. Burch para que fizessem um estudo sobre técnicas “humanitárias” em experimentos realizados com animais. Esse estudo resultou no livro *The Principles of Humane Experimental Technique*, publicado em 1959, no qual preconizam as técnicas humanitárias de acordo com o princípio dos 3Rs, *Replacement, Reduction* e *Refinement*, (HUBRECHT; CARTER, 2019), em português: Substituição (não usar animais quando puderem ser substituídos), Redução (redução do número de animais utilizados) e Refinamento (preocupação com o processo de refinamento das técnicas utilizadas na experimentação e o bem-estar animal).

Russell e Burch descreveram os 3Rs nesta ordem: *replacement, reduction* e *refinement*, refletindo como estes deveriam ser abordados. Entretanto, como afirmam Rossi e Oliveira (2020), não há dúvida de que, dentre os 3Rs, a substituição dos animais por métodos alternativos é o principal objetivo. Porém, hoje “r” do refinamento é considerado fundamental, já que está relacionado à busca e à promoção do bem-estar animal. Desta forma, considerando o conceito dos 3Rs, o desenho experimental bem delineado, um bom trabalho estatístico e, quando necessária, a determinação do ponto final humanitário (*endpoint*) são prerrogativas do refinamento.

Ainda de acordo com Rossi e Oliveira (2020), a aplicação do princípio dos 3Rs não impede a utilização de modelos animais nem do desenvolvimento científico, mas foi extremamente importante para que a experimentação animal fosse conduzida de forma ética, consciente e humanitária. Segundo Tannenbaum e Bennett, (2015), o tratamento mais humano possível de animais experimentais, longe de ser um obstáculo, é na verdade um pré-requisito para experiências bem-sucedidas com animais.

2 | DIRETRIZES NACIONAIS E INTERNACIONAIS

Uma série de diretrizes nacionais e internacionais estão disponíveis para auxiliar os pesquisadores na determinação do *endpoint* para animais de pesquisa. O *Office of Laboratory Animal Welfare* (OLAW) utiliza como critério para desfechos humanitários a aplicação da eutanásia antes de terminar o estudo experimental, a fim de evitar ou parar a dor e/ou angústia dos animais. Uma característica importante dos *endpoints* humanitários é que eles devem garantir que os objetivos do estudo ainda sejam alcançados, mesmo que o estudo seja encerrado em um ponto anterior. Idealmente, são buscados desfechos humanitários que possam ser usados para encerrar os estudos antes do início da dor e angústia (OLAW/ARENA 2002, p. 103).

O *Canadian Council for Animal Care* (CCAC) publicou um excelente documento com recomendações gerais sobre *endpoint* em estudos com animais. De acordo com as diretrizes

do CCAC, em experimentos envolvendo animais, qualquer dor, angústia ou desconforto real ou potencial deve ser minimizado ou aliviado pela escolha do desfecho mais precoce compatível com os objetivos científicos da pesquisa. O pesquisador, antes de iniciar uma pesquisa, deve consultar um veterinário que trabalhe com animais de laboratório e o comitê de cuidados com animais para estabelecer os parâmetros necessários para a avaliação da dor e estabelecer o momento do *endpoint* (CCAC, 1998, p. 5).

Em 1994, a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) criou um grupo de trabalho para desenvolver um documento de orientação usando sinais clínicos como parâmetros humanitários em estudos de avaliação de segurança (OECD, 2000). O documento resultante apresentou critérios baseados nos princípios dos 3Rs, bem como descrições de sinais clínicos para auxiliar os pesquisadores a determinarem quando a morte pode ser iminente ou quando dor intensa pode estar presente após a exposição de um animal a uma substância de teste. Os critérios são amplos o suficiente para serem aplicados a uma extensa gama de tipos de estudo, substâncias de teste, espécies e cepas de animais.

O Princípio dos 3Rs foi um marco importante no contexto das técnicas experimentais humanitárias, que foi incorporado à Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008.

3 | HISTÓRICO DA LEGISLAÇÃO RELACIONADA AO PONTO FINAL HUMANITÁRIO

Quando falamos de legislação relacionada ao uso de animais no ensino e pesquisa científica no Brasil, devemos sempre levar em consideração o período pré e pós Lei Arouca (Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008) como marco de evolução e mudança em direção ao uso mais racional e pautado no princípio dos 3 Rs e no bem-estar animal.

Em 1998, foi promulgada a Lei nº 9605, de crimes ambientais, que, em seu art. 32, previa o crime de maus tratos aos animais e estabelecia penas para tais atos, a fim de promover a proteção e o bem-estar dos animais estabelecido no art. 225 §1, Item VII da Constituição da República Federativa do Brasil de 1988 (CF/88).

Em 8 de outubro de 2008, conforme mencionado anteriormente, foi sancionada a Lei nº 11794, popularmente conhecida como Lei Arouca (em homenagem a seu autor), após longos 13 anos tramitando no Congresso Nacional. Ela revogou a Lei nº 6638, de 8 de maio de 1979 e veio, definitivamente, regulamentar o uso de animais no ensino e pesquisa científica.

No que tange ao tema deste capítulo, o art. 14, § 1º, estabeleceu as condições em que poderiam ser executados a eutanásia e o ponto final humanitário, a fim de preencher uma lacuna enquanto o Conselho Nacional de Controle a Experimentação Animal (CONCEA) ainda não os havia normatizado segundo as recomendações do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), através de resolução normativa.

4 | O PONTO FINAL HUMANITÁRIO NA LEI AROUCA

O §1º, art. 14, da Lei nº 11.794/2008, inicialmente, trata da eutanásia dos animais que foram submetidos às intervenções nos protocolos dos experimentos ou programas de aprendizado. Sempre que encerrados os procedimentos, é recomendada a prática da eutanásia. Porém, o ainda não nominado ponto final humanitário também poderá ocorrer em qualquer momento durante as fases dos experimentos ou programas de ensino, quando ocorrer intenso sofrimento dos animais (dor ou estresse) que participam dos protocolos acima mencionados, ou quando for tecnicamente recomendado o procedimento (BRASIL, 2008).

5 | O PONTO FINAL HUMANITÁRIO NA RN 25, DE 29 DE SETEMBRO DE 2015 (INTRODUÇÃO GERAL DO GUIA BRASILEIRO DE PRODUÇÃO, MANUTENÇÃO OU UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA ATIVIDADES DE ENSINO OU PESQUISA CIENTÍFICA DO CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL) - CONCEA

A RN 25, de 29 de setembro de 2015 do CONCEA, estabelece normas para a aplicação do ponto final humanitário (*endpoint)* em complementação ao texto da lei Arouca e orienta que todos os protocolos de pesquisa devem considerar a possibilidade de incluir pontos finais humanitários, como meio de acrescentar alterações significativas no bem-estar animal, além das práticas de prevenção de dor e distresse. Como o encerramento do estudo acontece quando se alcançam os objetivos da pesquisa ou da atividade educacional, esse encerramento antecipado (ponto final humanitário) ocorre para evitar dor, desconforto ou distresse no animal, ou este é finalizado por ações de tratamento que aliviem a dor, desconforto ou distresse, interrompam um procedimento doloroso, excluam o animal do estudo ou que promovam a sua morte humanitária (BRASIL, 2015).

O ponto final deve ter o equilíbrio entre a obtenção do resultado da pesquisa e a minimização do sofrimento animal. Além disso, deve estar sempre presente nos projetos, com a descrição dos pontos finais humanitários apropriados para a espécie animal e o respectivo procedimento que será usado.

Cabe ao pesquisador, com base no seu conhecimento prévio sobre o estudo, identificar, explicar e incluir no protocolo de estudo um ponto final, que concilie a necessidade científica e o bem-estar dos animais; e, sempre que possível, antes de iniciar um estudo, realizar um piloto para que possa avaliar a dor e o distresse que podem ocorrer durante os procedimentos, a fim de basear a necessidade do ponto final em evidências, reduzindo sofrimento não previsto e a morte antecipada e desnecessária de animais, para que o bem-estar seja menos comprometido, antes do objetivo da pesquisa ser atingido. E, ainda, levar em conta a severidade do procedimento e potenciais melhorias.

6 | A RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 37 DO CONCEA

A Resolução Normativa nº 37 do CONCEA baixa a diretriz da prática da eutanásia e revoga a Resolução Normativa de nº 13 do mesmo órgão.

As definições e critérios a serem adotados são semelhantes aos da diretriz anterior, porém, no item 2.6 do anexo, enfatiza-se a necessidade de adoção do procedimento de ponto final humanitário, com o encerramento antecipado dos procedimentos, a fim de evitar dor, desconforto ou distresse do animal através de algumas ações, tais como: tratamento para aliviar a dor, desconforto ou distresse; interrupção de procedimento doloroso; retirada do animal do estudo; ou, por fim, a morte humanitária do animal, como previsto na Resolução Normativa nº 25, de 29 de setembro de 2015 (BRASIL, 2018).

7 | A ATUALIZAÇÃO DO DBCA (DIRETRIZ BRASILEIRA PARA O CUIDADO E A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA FINS CIENTÍFICOS E DIDÁTICOS) RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 55, DE 5 DE OUTUBRO DE 2022 DO CONCEA

A recente atualização da DBCA pelo CONCEA contém modificações no item 5.3 - referentes às propostas encaminhadas à CEUA - e no item 6.2 - que trata do planejamento dos projetos e elenca uma série de questões que devem ser consideradas pelos pesquisadores e professores antes de enviarem uma proposta à CEUA - que dizem respeito ao bem-estar e à finalização humanitária.

O item 7, que versa sobre a conduta durante a realização de projetos, em especial a detecção de dor e estresse, bem como o seu controle nos respectivos itens 7.1 e 7.2, estabelece que todos os envolvidos na atividade científica ou de ensino que utilizem animais devem conhecer o comportamento normal da espécie escolhida, bem como os sinais de dor e sofrimento ou estresse específico da espécie, e realizar monitoramento constantemente para avaliar os animais.

Sempre que se verificar o desvio de padrão normal de comportamento, ele deve ser relatado e registrado em livro próprio e medidas cabíveis devem ser tomadas para impedir ou minimizar suas consequências para os animais.

Quanto ao controle de dor e distresse, deve ser avaliado pelos responsáveis de forma similar aos humanos, a não ser que haja evidência em contrário. Também é de responsabilidade dessas pessoas as medidas cabíveis para evitar ou minimizar a dor e o estresse, não só com a escolha adequada dos métodos humanitários, mas também com a devida avaliação dos animais durante os procedimentos, levando em conta o grau de invasividade da manipulação para melhor detecção de dor e estresse, bem como os cuidados devidos, capacitação da equipe para uma melhor identificação desses sinais, prazo do estudo, critérios de intervenção precoce e ponto final humanitário e métodos apropriados para eutanásia.

A premissa do bem-estar animal e supressão ou diminuição de dor e estresse deve

sempre ser levada em conta e prevalecer sobre a conclusão de um estudo (BRASIL, 2022).

8 | O ENSINO EM CAL

A experimentação animal, bem como ações de criação e desenvolvimento de biomodelos experimentais, foram extremamente importantes para a evolução dos conhecimentos nos campos da biologia, medicina humana e veterinária. Os estudos realizados em animais de laboratório permitiram o conhecimento de anatomia, fisiologia, parasitologia imunologia e virologia, bem como de outras áreas. É inegável que essas pesquisas permitiram um avanço considerável no desenvolvimento da ciência e tecnologia, porém, por muito tempo os animais utilizados foram relegados a um segundo plano dentro do contexto científico. Há pouco tempo deu-se importância ao modelo animal, considerando sua qualidade genética e sanitária, bem como a promoção do bem-estar, para que os resultados experimentais fossem confiáveis e reprodutíveis (FLAJBLAT *et al.*, 2008). Como postulava Paulo Freire, patrono da educação brasileira, “Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino” (FREIRE, 2000), portanto, é importante pontuar que a pesquisa experimental se desenvolveu a despeito das atividades de ensino e capacitação.

O desenvolvimento da Ciência em Animais de Laboratório (CAL), como uma ciência multidisciplinar, incluindo sanidade, genética, manejo, bem-estar e educação, é muito recente. Em um passado não muito longínquo, o bioterista ou técnicos em biotérios não eram valorizados nem capacitados para trabalhar na área, e o animal experimental era relegado a um segundo plano (RANGEL, 2017). Essa realidade começou a ser alterada com a aplicação do Princípio dos 3 Rs como base da CAL. Apesar de o livro de Russell e Burch ter sido publicado em 1959, como já mencionado, o conceito levou pelo menos 10 anos para ganhar robustez.

É interessante observar que em 1950, antes mesmo do livro ser publicado, cinco veterinários se reuniram em Chicago e fundaram a *Animal Care Panel* (ACP), que, em 1967, tornou-se a *American Association for Laboratory Animal Science* (AALAS), que é uma associação que existe até hoje e promove o cuidado responsável com animais de laboratório e oferece uma série de oportunidades e recursos educacionais, além de ser uma forma de fazer a difusão e padronização do conhecimento. O primeiro colégio de medicina de animais de laboratório surgiu em 1957, porém, em 1961, passou a se chamar *American College of Laboratory Animal Medicine* (ACLAM), que é reconhecido pela Associação Médica Veterinária Americana como a associação certificadora da medicina animal de laboratório. Em 1953 e 1956, respectivamente, foram criados o *Institute for Laboratory Animal Research* (ILAR) e o *International Committee on Laboratory Animal Science* (ICLAS), os quais têm por objetivo a padronização internacional da CAL. Em 1965, foi criada a Associação Americana de Credenciamento de Cuidados com Animais de Laboratório (AAALAC), sendo que em 1996 adicionou-se o “Internacional” em seu nome para simbolizar seu reconhecimento

internacional e o compromisso de aprimorar as ciências das vida e o cuidado de animais em todo o mundo. Portanto, é importante frisar que nos Estados Unidos da América, desde os anos 50 do século XX, tem havido um crescimento da CAL e uma preocupação crescente com a formação nessa área (ROSSI, 2021).

Na Europa, a entidade de referência é a *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA), que representa interesses comuns na promoção de todos os aspectos da CAL na Europa e além. A FELASA possui um sistema de acreditação por categorias ou função, seguindo a diretiva da União Europeia 2010/63. Em 2014, esse documento foi modificado, alterando o sistema de credenciamento, que antes era baseado em quatro categorias (com base no cargo), para outro baseado em funções, da seguinte forma: Função A - aplicação de procedimentos a animais; Função B - elaboração de projetos e procedimentos; Função C - cuidar de animais; e Função D - eutanásia em animais. Cabe ressaltar a importância dessa categorização porque, a partir desse credenciamento, só é permitida a entrada no biotério ou laboratório de experimentação para executar uma tarefa se o técnico ou pesquisador estiver qualificado para desenvolver aquela função específica (ROSSI, 2021).

Em 1983, no Brasil, o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) foi fundado com objetivo de defender o bem-estar animal e seu uso racional, capacitar profissionais e lutar por uma legislação específica. Em 2008, o nome foi alterado para Sociedade Brasileira da Ciência em Animais de Laboratório, mantendo em sua sigla SBCAL/COBEA. É importante pontuar que, na época de sua fundação, não havia ainda legislação, a não ser a Lei nº 6638/1979, sobre a vivissecção, que ainda nem havia sido regulamentada. Só anos depois, em 1988, já na nova Constituição Federal, o tema da proteção animal surgiu sob a forma de um artigo proibindo a crueldade animal. A Lei Arouca, de 8 de outubro de 2008, é considerada como nosso marco legal e regulamenta o inciso 7 do parágrafo 1 do artigo 225 da Constituição Federal, e revoga a Lei nº 6638/1979. Essa lei é importante, pois normatiza a utilização de animais em estabelecimentos de ensino superior, de educação profissional técnica de nível médio na área biomédica e instituições de pesquisa. Já não há a utilização de animais em outros níveis de ensino. Em 2012, foi criada a Revista da Sociedade Brasileira em Ciência de Animais de Laboratório (RESBCAL), um dos principais veículos de divulgação do conhecimento científico em animais de laboratório. Em 2022, a RESBCAL foi internacionalizada e tornou-se a *Biological Models Research and Technology* (BMRT) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO, 2022).

No Brasil, várias iniciativas de capacitação ocorreram, como a criação do programa CEMIB - Centro Multi-Institucional de Bioterismo, em 1983, que teve a participação de três instituições paulistas de ensino e pesquisa: a Universidade de São Paulo, a Escola Paulista de Medicina e a Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Porém, o CEMIB possuía escopo de atuação mais limitado, circunscrito às instituições citadas.

Dentro dessa questão de capacitação, o Instituto de Ciência e Tecnologia em

Biomodelos (ICTB) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), ainda sob o nome de Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL), disponibiliza desde 1998 cursos na área do bioterismo (o nome anterior para ciência em animais de laboratório). Em 2016, há a mudança de nome para ICTB, a partir da implementação do Mestrado Profissional em ciência de animais de laboratório (MPCAL), que é um curso de pós-graduação *stricto sensu* singular e possui a missão de formar e capacitar profissionais para produzir conhecimento em CAL, buscando excelência científica e tecnológica.

9 | CAPACITAÇÃO E A FINALIZAÇÃO HUMANITÁRIA

A capacitação é um dos pilares éticos mais importantes na formação de profissionais e colaboradores que exercem suas atividades na experimentação animal. A formação continuada e atualizada é extremamente importante para a execução de procedimentos e técnicas que confiram robustez e repetibilidade aos resultados experimentais, bem como objetiva o bem-estar animal (KUZEL *et al.*, 2012; FENTENER VAN VLISSINGEN *et al.*, 2015).

Paulo Freire postulou sobre o conhecimento e afirmou: “Ao ser produzido, o conhecimento novo supera outro que antes foi novo e se fez velho e se ‘dispõe’ a ser ultrapassado por outro amanhã” (FREIRE, 2000). Portanto, os assuntos pertinentes à CAL precisam ser constantemente atualizados e os pesquisadores, colaboradores, entre outros usuários, precisam ter essa percepção sobre o assunto, principalmente no tocante a um tema tão sensível quanto a finalização humanitária.

De acordo com Tannenbaum e Bennett (2015), Russel e Burch utilizaram algumas vezes, em seu livro, os termos desumanidade (ou desumano) e humanidade (ou humano) para se referir a estados mentais vivenciados por animais experimentais e aos procedimentos ou formas de tratar animais que produzem esses estados mentais. Desta forma, uma pesquisa só pode ser considerada dentro desse conceito de humanidade quando os objetivos da pesquisa são alcançados antes que o animal vivencie dor intensa, distresse ou experimente estados mentais extremos. A redução do sofrimento animal nas pesquisas, para além das questões éticas ou morais, está diretamente associada à qualidade dos dados obtidos (CARBONE; AUSTIN, 2016). Segundo Duncan (2006), o sofrimento inclui uma ampla gama de estados emocionais desagradáveis, como medo, tédio, dor e fome.

Para que os dados científicos sejam validados e fidedignos, é importante a determinação do ponto final humanitário, caso seja necessário, uma vez que o animal muito debilitado pode apresentar alterações que afetem os processos fisiológicos, metabólicos e, consequentemente, interferir na resposta imunológica. Além disso, a análise de amostras coletadas de animais muito debilitados ou já mortos pode interferir significativamente nos resultados da pesquisa (MORTON, 2000). Embora o ideal seja evitar a dor, a equipe também precisa garantir que os objetivos do estudo sejam alcançados antes que o animal

seja eutanasiado (OLAW/ARENA 2002, p. 103).

Para a determinação do ponto final humanitário em um experimento, são necessários planejamento, pesquisa e conhecimento dos efeitos de um determinado ensaio sobre o animal. Dentro desse contexto, a capacitação dos profissionais envolvidos na pesquisa é fundamental para poder atuar de forma ética, com conhecimento da espécie e da manipulação adequada, compreendendo as necessidades comportamentais e fisiológicas. Diminuindo-se, assim, o desconforto animal, para além da aplicação do refinamento, um experimento sem viés causado por alterações decorrentes de distresse ou eutanásia tardia pode fornecer informações robustas que poderão ser úteis à reprodutibilidade de experimentos (WÜRBEL, 2017).

Desta forma, considerando todas as possíveis variáveis para a evolução da CAL, é importante que o ensino e a capacitação continuada de profissionais da área sejam estimulados para que os experimentos sejam realizados de forma ética, com o mínimo de sofrimento e espoliação dos biomodelos experimentais, bem como haja a obtenção de dados fidedignos, robustos e reprodutíveis. É importante registrar que a estrutura de capacitação e treinamento de pesquisadores e profissionais envolvidos com a CAL varia consideravelmente entre os países dos vários continentes, sendo imprescindível que as federações nacionais e internacionais de CAL façam esforços no sentido de estabelecer um sistema harmonizado de capacitação e formação desses profissionais. Nesse sentido, Hendriksen e Morton (1999) afirmam que é fato que os parâmetros humanitários utilizados em experimentos com animais sofrem constantes mudanças. Portanto, todos os cientistas, gerentes, técnicos, comitês de supervisão e reguladores envolvidos com a experimentação animal, onde a dor é um componente potencial, devem participar das capacitações e discussões sobre o tema. Os critérios para determinar o fim humanitário de um estudo devem ser frequentemente reavaliados e revisados à medida em que novas informações se tornam disponíveis (STOKES, 2002). A busca sustentada desses esforços direcionados resultará em um uso de animais mais humano.

REFERÊNCIAS

BRASIL. **Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008**. Regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico dos animais; revoga a Lei nº 6.638, de 08 de maio de 1979; e dá outras providências. Publicada no D.O.U. em 09.10.2008. Disponível em: <http://www.planaltp.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm> Acesso em: 10 jan. 2018.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações. **Resolução Normativa nº 25 do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA)**. Baixa o Capítulo “Introdução Geral” do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais para Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. Publicada no D.O.U. de 02.10.2015, Seção I, Pág. 4. Republicada no D.O.U. de 06.10.2015, Seção I, p. 6. Disponível em:<https://www.gov.br/mcti/ptbr/composicao/conselhos/concea/arquivos/arquivo/legislacao/resolucao-normativa-no-25-de-29-de-setembro-de-2015.pdf> Acesso em: 13 jan. 2023.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações. **Resolução Normativa nº 37 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA)**. Baixa diretriz da prática de eutanásia. Publicada no D.O.U. de 22.02.2018, Seção I, p. 5. Disponível em: <http://www.mcti.gov.br/mcti/export/site/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/RN-37.pdf > Acesso em: 10 jan. 2018.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações. **Resolução Normativa nº 55 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA)**. Atualiza o texto da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de ensino ou de Pesquisa Científica - DBCA. Publicada no D.O.U. de 07.10.2022, Seção I, p. 10. Disponível em: <https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/Resolucao_normativa_Concea_55_de_05102022.html> Acesso em: 10 jan. 2023.

CARBONE, L.; AUSTIN, J. **Pain and laboratory animals**: Publication practices for better data reproducibility and better animal welfare. PLoS ONE, 11(5), 1–24, 2016. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155001

DUNCAN, I. J. H. The changing concept of animal sentience. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 100, p. 11-19. 2006 DOI: https://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.04.011.

FENTENER VAN VLISSINGEN, J.; LELOVAS, P.; TORRES, Y. S.; BORRENS, M.; MORRISON, F.; GIROD, A. The reporting of clinical signs in laboratory animals. **Laboratory Animals**, v. 49, n. 4, 267–283, 2015. https://doi.org/10.1177/0023677215584249

FRAJBLAT, M.; AMARAL, V. L. L.; RIVERA, E. A. B. Ciência em animais de laboratório. **Ciência e cultura**, v. 60, n. 2, p. 44-46, 2008.

FREIRE, A. M. **Paulo Freire**. Pedagogia da autonomia: saberes necessários à prática educativa. 16. ed. Paz e Terra, São Paulo, Brasil, 165 p, 2000. ISBN 85-219-0243-3.

HENDRIKSEN, C. F. M.; MORTON, D. B. (editors). **Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research**. Proceedings of the International Conference; 22–25 November 1998; Ziest, The Netherlands. London: The Royal Society Medical Press; 1999.

HUBRECHT, R. C. & CARTER, E. The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change. **Animals**, v.9, n.10, p.754, 2019. doi: 10.3390/ani9100754.

KUZEL, M. A. A. *et al*. A importância da qualificação profissional e o trabalho em equipe no biotério de experimentação. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, São Paulo, v.1 n. 3, p. 263-269, 2012.

MORTON, David B. A systematic approach for establishing humane endpoints. **ILAR Journal**, v. 41, n. 2, p. 80-86, 2000.

OLAW/ARENA (Office of Laboratory Animal Welfare/Applied Research Ethics National Association). **Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook**. 2nd ed. Bethesda: National Institutes of Health; 2002.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. **Guidance document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation** - Series on testing and assessment nº 19. Paris: OECD Enviromental Health and Safety Publications, 2000.

RANGEL, H. A. **A Evolução da Ciência de Animais de Laboratório no Brasil**. *In*: LAPCHIK, V. B. V; MATTARAIA, V. G. M; KO, G. M. Cuidados e Manejo de animais de laboratório. 2 ed. P. 3-8. Rio de Janeiro: Atheneu, 2017.

REZENDE, A. H.; PELUZIO, M. C. G.; SABARENSE, C. M. Experimentação animal: ética e legislação brasileira. **Rev. Nutr**., v.21, n.2, 2008. https://doi.org/10.1590/S1415-52732008000200010

RIVERA, E. A. B. Ética na experimentação animal. *In*: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (org.). **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6

ROSSI, M. I. D. In COSTA, M. L.; MERMELSTEIN, C. (org.) Os Modelos Animais em Biologia e Medicina 2- Aspectos Éticos: Formação de pessoal em Ciência em Animais de Laboratório. *In*: **Fronteiras da Biologia e da Medicina** - Livro de Conferências da Cátedra Carlos Chagas Filho de Fronteiras da Biologia e da Medicina do CBAE da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

ROSSI, M. I. D.; OLIVEIRA, G. M. O Princípio Ético dos 3rs a Base de uma Diretriz Institucional para a Ciência de Animais de Laboratório. **RESBCAL/SBCAL** v. 8, p. 15 - 18, 2020.

RUSSELL, W. M. S. & BURCH, R. L. **The Principles of Humane Experimental Technique**. Methuen, Londres, 1959.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO – SBCAL. **A Sociedade**: Histórico. 2022. Disponível em: <https:// https://www.sbcal.org.br/conteudo/view?ID_CONTEUDO=87>. Acesso em: 04 de março de 2023.

STOKES, W. S. Humane Endpoints for Laboratory Animals Used in Regulatory Testing Moribund Condition as a Current Humane Endpoints for Safety Testing. **ILAR Journal**, 43, S31–S38, 2002

TANNENBAUM, J.; BENNETT, T. Russell and Burch’s 3Rs Then and Now: The Need for Clarity in Definition and Purpose. **J Am Assoc Lab Anim Sci**., v. 54, n. 2, p. 120–132, 2015.

WÜRBEL, H. More than 3Rs: the importance of scientific validity for harm-benefit analysis of animal research. **Lab Animal**, v. 46, n. 4, p. 164–166, 2017.

AVALIAÇÃO E INTERVENÇÃO CLÍNICA EM MODELO MURINO

Data de aceite: 03/07/2023

Monique Ribeiro de Lima
Centro de Experimentação Animal, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz,
Rio de Janeiro/RJ
ORCID 0009-0008-8745-9522

1 | INTRODUÇÃO

Os animais desempenham um papel fundamental como modelos para as pesquisas biomédicas, além da compreensão e descobertas de tratamentos para uma ampla gama de doenças humanas e animais. Os animais também são importantes na determinação da eficácia e segurança de vacinas, medicamentos, produtos de consumo e muitas outras substâncias. No entanto, o bem-estar dos animais usados nos testes pode ser afetado negativamente pela dor e o desconforto resultantes da indução de doenças ou toxicidade. As normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) determinam que as dores devem ser evitadas ou, se inevitáveis, devem ser limitadas apenas ao necessário para atingir os objetivos do estudo.

Apesar de ser o primeiro passo para o entendimento das doenças, o experimento *in vivo* é o principal elo entre os estudos *in vitro* e os ensaios clínicos em humanos, e todos os indivíduos que utilizam animais para atingir os objetivos científicos e experimentais têm responsabilidades ética e legal em minimizar a dor e/ou desconforto animal.

O ponto final humanitário ou *humane endpoints* pode ser definido como o primeiro indicador de dor e/ou desconforto no animal experimental e pode ser implementado com base nas diretrizes éticas e científicas para restringir ou encerrar a dor e o desconforto por meio de ações específicas. Entre as estratégias práticas para minimizar ou evitar a dor e o desconforto, incluem-se o uso de medicamentos, cuidados veterinários, aclimatação e consideração de alternativas de substituição e redução. A consideração e o uso apropriado dessas práticas podem ajudar a manutenção do bem-estar ideal

para animais usados em pesquisas e testes biomédicos.

Os pontos finais humanitários são pontos de corte nos quais o experimento ou o uso de um determinado animal deve ser interrompido para evitar dor ou desconforto. Eles podem ser de dois tipos: relacionados à gravidade e relacionados aos objetivos. Os primeiros são voltados ao modo como um animal pode estar fisiologicamente afetado a ponto de não fornecer dados científicos confiáveis, ou quando o grau de sofrimento vai além do provável benefício do estudo ou é eticamente inaceitável. O ponto final relacionado aos objetivos surge quando o propósito de um experimento foi alcançado ou é inatingível, de modo que a perturbação envolvida na continuação, por menor que seja, é desnecessária (MORTON, 1999).

Para Linda Toth (2018), deve haver pelo menos duas considerações para selecionar os pontos finais humanitários apropriados para qualquer experimento. Primeiro, o propósito científico do experimento deve ser claramente compreendido e bem justificado, e o segundo recurso-chave para selecionar o ponto final ideal é a prevenção ou minimização de danos aos animais.

A definição dos pontos finais humanitários deve fazer parte de todos os protocolos experimentais enviados para a apreciação das Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUA) e deve abordar os pontos específicos para cada protocolo. É ideal que os objetivos científicos e os objetivos do estudo possam ser alcançados sem efeitos adversos, dor ou distresse. A prevenção de dor e distresse requerem conhecimento do comportamento normal da espécie em questão e dos efeitos adversos esperados.

Embora todos os estudos devam empregar pontos finais humanitários, os estudos que geralmente requerem consideração especial incluem aqueles que envolvem modelos de tumor, doenças infecciosas, desafio de vacina, modelagem de dor, trauma, produção de anticorpos monoclonais, avaliação de efeitos toxicológicos, falência de órgãos ou sistemas e modelos de choque cardiovascular (ILAR, 2014).

Muitas abordagens foram desenvolvidas para facilitar a avaliação da condição física dos animais experimentais. Algumas estratégias se concentram na avaliação do bem-estar animal com referência a listas completas de sinais clínicos que podem refletir dor, distresse ou morbidade. Os sinais clínicos e comportamentais podem certamente indicar doença, e muitos provavelmente denotam dor ou desconforto. No entanto, muitos sinais clínicos considerados críticos podem não sinalizar morte iminente. Assim, alguns sinais podem indicar doença ou distresse, mas não são particularmente úteis para prever a morte do animal (TOTH, 1997).

O emprego de folhas de pontuação (*checklists*), nas quais uma série de efeitos adversos potenciais podem ser pontuados por gravidade, e a pontuação acumulada é avaliada com uma frequência adequada, pode ser uma ajuda útil para identificar animais com dor ou desconforto e, também, ajudar na avaliação da gravidade do procedimento. Os pontos finais humanitários podem ser construídos de antemão com base em prováveis

efeitos adversos, ou a partir de informações coletadas em estudos-piloto, mas devem ser atualizados à medida que o experimento avança para refletir os efeitos adversos observados (MORTON E GRIFFITHS, 1985).

Para Hendriksen e colaboradores (2011), a finalização humanitária pode ser entendida como uma estratégia de refinamento projetada para minimizar a dor ou desconforto experimentados por animais durante um ensaio experimental. Como tal, esse conceito representa um importante mecanismo para a aplicação dos 3R's, e a literatura publicada ao longo dos últimos anos ilustra como o uso eficaz das finalizações humanitárias desenvolveu-se juntamente com outros procedimentos de refinamento, em resposta aos esforços para melhoria do bem-estar animal. Essa descrição reflete o progresso dos últimos anos na tentativa de prevenir o sofrimento evitável de animais de laboratório, através do reconhecimento de desfechos mais humanos como um componente fundamental na aplicação dos princípios dos 3R's.

2 | COMPORTAMENTO NATURAL

O conhecimento do comportamento natural das espécies fornece informações úteis para avaliar seu bem-estar, e a maneira como um animal de laboratório pode se envolver em seu repertório comportamental natural determina, em grande medida, o seu estado de bem-estar. Durante o período de aclimatação, os pesquisadores devem se familiarizar com o comportamento normal de um animal específico ou grupo de animais na situação da pesquisa. Níveis normais de padrões fisiológicos como frequência respiratória, frequência cardíaca, temperatura corpórea e marcadores bioquímicos ou hormonais podem também ser estabelecidos durante este período (BRASIL, 2015).

Os sinais clínicos (por definição, aqueles observáveis) fornecem potencialmente um objetivo, em vez de um julgamento subjetivo da dor e distresse do animal. No entanto, para que tais sinais sejam representativos, os observadores devem ter boa capacidade de observação, conhecimento do que é normal para aquele animal individual, linhagem e espécie e boas habilidades clínicas. Idealmente, deve-se ter uma atitude empática e a melhor estratégia para avaliação é envolver todos os que estão no trabalho de pesquisa, onde cada membro trará um enfoque diferente. Para Morton (2000), os cuidadores "conhecem" seus animais e suas particularidades, os veterinários possuem habilidades clínicas e os pesquisadores reconhecem os efeitos colaterais potenciais de seus procedimentos científicos, levando a um melhor ajuizamento das observações.

A capacidade atual de criar camundongos geneticamente modificados altamente sofisticados, inserindo-se transgenes ou mutações direcionadas em genes endógenos, tornou o camundongo de laboratório o animal experimental mais amplamente utilizado, ampliando o número de linhagens disponíveis. Consequentemente, há uma grande diversidade de características comportamentais e de valores fisiológicos.

O padrão comportamental de um camundongo (*Mus musculus*) de laboratório é determinado, em grande parte, pelas oportunidades oferecidas pelo ambiente. O alojamento deve, idealmente, ser baseado na criação de condições que ofereçam a maior variedade possível de atividades naturais, como exploração, descanso, escalada, higiene, forrageamento, nidificação e comportamento social. Para esse fim, é importante a implementação de um programa de Enriquecimento Ambiental como um compromisso entre as necessidades do animal e o que é viável em um ambiente de laboratório. De modo geral, um camundongo de laboratório saudável é alerta, curioso, envolve-se em interações sociais, possui aparência saudável, limpo e ativo (SIROIS, 2007).

Os camundongos possuem uma área de superfície relativamente grande por grama de peso corporal, o que os torna sensíveis a grandes flutuações na temperatura ambiente. Devido a essa grande proporção de superfície evaporativa para massa corporal, o camundongo tem uma sensibilidade maior à perda de água do que a maioria dos mamíferos. A ingestão diária de alimentos do camundongo é de cerca de 15g por 100g de peso corporal e de líquidos é de cerca de 15mL por 100g de peso corporal. Devido à sua relação superfície/volume desfavorável e sua alta taxa metabólica, os camundongos são extremamente sensíveis à perda de fluido/desidratação (JACOBY *et al*., 2002, BAUMANS, 2006). Além disso, são animais noturnos e quase não têm percepção de cores, sendo sensíveis à luz de alta intensidade, especialmente em albinos, e são capazes de ouvir sons fora da faixa de frequência audível para humanos (ultrassom) (HEFFNER; HEFFNER, 2007).

A construção de ninhos é comum em espécies de roedores. Camundongos selvagens constroem ninhos para fornecer calor, abrigo contra predadores e competidores e para permitir uma reprodução bem-sucedida. A construção de ninhos aumenta o sucesso reprodutivo ao longo da vida, sendo uma adaptação termorreguladora essencial (HESS *et al*., 2008).

O rato de laboratório (*Rattus norvegicus*) possui comportamento exploratório para orientação em seu ambiente; são animais noturnos e sociais. A habitação individual pode levar ao tédio e potencialmente resultar em comportamento estereotipado. Cerca de 40% do tempo de um rato é gasto mantendo a pelagem e o corpo limpos, geralmente depois de se alimentar, beber ou explorar. A diminuição do asseio rapidamente se torna aparente e pode ser vista ao redor do ânus e na forma de uma secreção marrom-avermelhada ao redor do olho (cromodacriorreia) produzida pela glândula Harder. Os ratos são capazes de reconhecer humanos individualmente e, consequentemente, é importante que eles estejam familiarizados com as pessoas que os manipulam e os alimentam (ANDERSEN, 2004). Também são sensíveis a grandes flutuações de umidade e frequência de ventilação; ou seja, problemas respiratórios e constrição em anel da cauda[1] estão associados a umidade

1 A cauda anelada é uma condição patológica de roedores de laboratório caracterizada por constrições anulares que afetam a cauda e, menos frequentemente, os membros posteriores, levando a necrose distal e, eventualmente, auto-

relativa alta e baixa, respectivamente. De modo geral, o rato de laboratório saudável é alerta, curioso, interativo, limpo e ativo. Os ratos jovens são mais ativos que os animais mais velhos e as fêmeas são geralmente mais ativas que os machos.

Os ratos, assim como os camundongos, possuem hábitos noturnos, período no qual se alimentam e apresentam maior atividade. Adaptam-se bem em diversas condições e preferem ambientes que lhes permitam explorar e escalar. A mastigação constante é importante para evitar o crescimento dos seus incisivos, que é contínuo (LAPCHIK *et al.*, 2009; SIROIS, 2007).

3 | PARÂMETROS OBSERVÁVEIS: CLÍNICO-COMPORTAMENTAL

Levar em consideração o comportamento de um animal nas condições em que está sendo mantido é indiscutivelmente tão importante - se não mais - quanto avaliações bioquímicas e fisiológicas, como glicemia, concentrações de creatinina e assim por diante. Animais que são mal socializados ou alojados inadequadamente quando jovens podem desenvolver padrões comportamentais anormais que se tornam aceitos como normais. Embora a literatura seja uma fonte valiosa de informações sobre o que é natural, não há substituto para a observação direta dos animais e a orientação de uma equipe especializada em cuidados com animais.

Embora seja difícil observar comportamentos e reconhecer a dor nos animais ou monitorar animais individuais (por exemplo, ingestão alimentar ou produção fecal e urinária) quando alojados em grupos, é possível observar seu comportamento, postura e aparência e interações um com o outro; por exemplo, eles podem se afastar de outros indivíduos do seu grupo social.

Comportamentos que podem ser observados facilmente de maneira não invasiva podem fornecer pistas sensíveis quanto às alterações fisiológicas de um animal em comparação com as ferramentas clássicas de monitoramento clínico (mensuração e temperatura, peso, frequências cardíacas e respiratórias). Observações na gaiola são especialmente vantajosas, pois impõem estresse mínimo ao animal e reduzem efeitos indesejados, como estresse por novidade ou outras alterações fisiológicas e comportamentais que podem ser causadas pelo ambiente desconhecido de um equipamento, por exemplo.

Os tipos de sinais e condições clínicas que podem ser observados variam desde os mensuráveis (paramétricos) até os de natureza qualitativa (não paramétricos). No entanto, ambos os tipos são de grande importância para a avaliação do bem-estar animal. Por exemplo, o peso corporal pode ser mensurado, enquanto a aparência de um animal com pelagem eriçada ou postura encurvada pode ser registrada como presente ou ausente (MORTON, 2000). A atividade, postura corporal, agressividade, resposta ao manuseio,

-amputação espontânea. Umidade ambiental inferior a 20% pode resultar na constrição em anel da cauda em ratos jovens (BAKER; LINDSEY; WEISBROTH, 1979).

vocalização, *grooming* e estereotipias são exemplos de parâmetros clínico-comportamentais que podem ser avaliados.

a. Expressões faciais

A percepção da dor varia entre os indivíduos, mas pode ser demonstrada de várias formas em diferentes espécies animais. Nesse contexto, as expressões faciais são um exemplo de demonstração de dor que pode ser empregado para avaliação do ponto final humanitário. A aplicação das escalas de caretas na ciência de animais de laboratório visa proporcionar a possibilidade de classificar intervenções e tratamentos específicos e garantir um melhor atendimento veterinário aos animais por meio da avaliação direta da condição de dor.

A pesquisa de Jeffrey Mogil e sua equipe demonstrou que as mudanças na expressão facial fornecem um meio confiável e rápido de avaliar a dor em camundongos e ratos. As 'escalas de careta' (*The Mouse Grimace Scale* – MGS e *The Rat Grimace Scale* - MRS) foram desenvolvidas inicialmente para ratos e camundongos, com base em mudanças faciais, como o estreitamento/fechamento dos olhos, protuberâncias nasais e de bochechas, posicionamento das orelhas e mudanças na posição e forma das vibrissas. Esses critérios são pontuados pelos observadores e classificados em graus de desvios em função do agravamento da condição de dor. As expressões faciais são pontuadas em uma escala de 0 a 2 por sua evidência em fotografias tiradas de gravações de vídeo digital. Uma pontuação de "0" indica que determinada expressão está ausente; pontuação "1" indica que determinada expressão é moderada e a pontuação de "2" indica que determinada expressão é evidente (escalas demonstradas no item 11 deste capítulo) (LANGFORD *et al*., 2010; SOTOCINAL *et al*., 2011).

A escala foi originalmente desenvolvida para identificar a dor aguda a partir das expressões faciais de camundongos, no entanto, a careta também pode ser induzida por outros fatores de estresse. Para avaliação da escala, os animais podem ser filmados e as fotos do vídeo classificadas e pontuadas manualmente. A avaliação também pode ser realizada ao vivo, em tempo real, por um examinador humano ou por captura de imagens individuais em caixas personalizadas para fotos. Langford e colaboradores (2010) demonstraram que o nível de experiência entre os observadores no uso da escala pode ter influência na precisão da técnica, determinada em 97% e 81% de confiança para pontuadores experientes e inexperientes, respectivamente. Portanto, tal avaliação requer adaptação do animal à condição experimental, e o observador precisa de treinamento e experiência para reconhecer e categorizar as expressões faciais.

Outras escalas de avaliações relacionadas ao fechamento dos olhos podem ser empregadas para avaliação do ponto final humanitário. Alguns estudos usam o percentual de abertura dos olhos como escore individual ou empregado juntamente com outros

parâmetros observacionais. Nunamaker e colaboradores (2013) empregaram a pontuação de 0 a 3 na avaliação dos olhos, onde 0 = olhos com mais de 75% de abertura; 1 = olhos com abertura de 50% a 75%; 2 = olhos abertos em 25% a 49%; e 3 = olhos com menos de 25% abertura, e quanto mais fechados estão os olhos, maior é a dor e o desconforto experimentados pelos animais (Figura 1).

b. Condição postural

Outro parâmetro simples de avaliar é a alteração de postura. Animais com fortes dores abdominais tendem a arquear o dorso quanto maior o grau de dor experimentado. A postura pode ser pontuada com base em uma aparência encurvada, podendo variar de zero a 3, isto é, da postura corporal normal; levemente curvada; moderadamente curvada e gravemente curvada, respectivamente (NUNAMAKER *et al*., 2013). A interpretação da postura curvada em roedores pode não ser um indicador confiável de dor devido ao fato de esses animais conseguirem encobrir sinais de dor leve, como parte de uma estratégia instintiva, visando evitar atrair a atenção de predadores. Com isso, o ocultamento dos sinais dificulta o monitoramento da dor.

c. Grooming

A dor não controlada também pode resultar em mudanças nos comportamentos normais, como higiene, consumo alimentar e hídrico e na reprodução (Figura 2). A diminuição generalizada do comportamento de *grooming* (higiene e asseio) pode ser evidenciada por uma pelagem áspera e suja, principalmente em mucosas nasais e regiões perianal e perioral. A falta de comportamento de higiene pode representar um efeito colateral fisiológico do envelhecimento, mas quando observados em animais jovens e adultos, esses sinais podem indicar algum desconforto, indicando a necessidade de atenção.

O *barbering* (*grooming* intenso) é um comportamento anormal que causa alopecia e comumente afeta várias linhagens de camundongos de laboratório. Em algumas linhagens, acredita-se que o puxão excessivo de pelos cause uma alopecia assimétrica principalmente no dorso e nos bigodes e, juntos, são chamados de barbeamento (REINHARDT, 2005). Para camundongos, os bigodes são uma importante fonte de informação sensorial, o que torna sua perda uma preocupação de bem-estar e uma fonte potencial de variação comportamental em dados de pesquisa. A alopecia induzida por barbeamento é um sinal potencial de comprometimento cerebral e pode indicar um ambiente estressante (Figura 3).

A aparência do pelo com piloereção, aspecto sujo ou emaranhado indica ausência de comportamento normal de higiene. Isso pode ser devido a uma situação estressante baseada em deficiência física (através do experimento) ou social. Nesse caso, a presença de mordidas, feridas ou comportamento agressivo pode indicar desequilíbrio social. Tal desequilíbrio pode ocorrer se um ou dois animais experimentais estiverem enfraquecidos,

resultando em uma mudança na hierarquia social. Portanto, recomenda-se que animais em experimento não sejam misturados com animais saudáveis durante o período do protocolo experimental.

d. Nidificação

O comportamento de nidificação é um importante fator evolutivo para a maioria dos roedores. Os camundongos constroem ninhos para abrigo contra predadores e competidores e como forma de compensar as mudanças nas temperaturas, fornecendo isolamento externo e criando um ambiente menos estressante. Além de ninhos maternos, construídos especificamente para reprodução, ambos os sexos constroem ninhos se fornecidos materiais adequados. Um ninho completo, com uma cúpula envolvendo o centro do ninho, permite que se crie um microambiente quente e escuro que pode ser até 10°C mais quente do que o restante do ambiente da gaiola (GASKILL *et al.*, 2013).

A construção de ninhos é um comportamento natural e mostrou ser um indicador de bem-estar para animais de laboratório. Uma redução no comportamento de nidificação pode sinalizar uma mudança no estado motivacional do animal e um bom desempenho parece ser indicador de bem-estar. A pontuação de complexidade do ninho pode ser implementada facilmente em qualquer instalação de animais de laboratório e pode ser aplicada na rotina diária para a detecção e avaliação de comprometimento após procedimento experimental.

A avaliação da nidificação é baseada no comportamento normal do animal realizado na gaiola e não requer aparelhos especiais ou instalações de alojamento específicas. O teste não causa estresse adicional aos animais, pois a construção de ninhos é uma forma específica e complexa de interação ativa com o meio ambiente. Fornecer material de ninho permite que os camundongos estruturem seu ambiente e ganhem mais controle sobre suas condições de vida.

Para Jirkof e colaboradores (2013), a pontuação de complexidade do ninho pode ser realizada da seguinte forma: escore 0 = material para ninho não manipulado; escore 1 = material levemente manipulado, mais de 80% do material para a construção do ninho intacto; escore 2 = material para ninho visivelmente manipulado, menos de 80% do material para a construção do ninho intacto; escore 3 = local de nidificação perceptível; menos de 80% do material para a construção do ninho intacto; escore 4 = ninho plano, paredes mais altas que os camundongos; e escore 5 = ninho complexo em forma de tigela, paredes mais altas que camundongos.

Uma ferramenta foi desenvolvida para uma avaliação simples capaz de identificar camundongos com bem-estar comprometido, o teste de tempo de integração ao ninho (TIN). Para realizá-lo, uma quantidade de material de nidificação é adicionada a uma gaiola de camundongo, e os comportamentos de nidificação que ocorrem imediatamente depois são observados. O teste TIN produz um resultado positivo quando um camundongo integra

o novo material de nidificação no local de nidificação principal em 10 minutos, e a falha em interagir com o material de aninhamento é definida como teste negativo, produzindo um resultado binário (ROCK *et. al*, 2014).

e. Distúrbios neurológicos

Os ambientes cativos geralmente reduzem a capacidade do animal de controlar e modificar seu ambiente, o que intrinsecamente pode ser estressante, e, em condições experimentais, esse controle pode ser drasticamente reduzido. O estresse pode levar a comportamentos anormais, conhecidos como estereotipias, devido a mudanças permanentes na fisiologia cerebral (GARNER, 2005). Comportamentos estereotipados e outros comportamentos repetitivos podem sugerir frustração motivacional ou disfunção cerebral e devem ser considerados como possíveis sinais de alteração no bem-estar animal, embora outros fatores também devam ser considerados.

Em camundongos de laboratório, as estereotipias incluem comportamentos como roer barras, pular de forma circular e girar. Comportamentos anormais, incluindo as estereotipias, são vistos com mais frequência na fase escura, quando os camundongos estão ativos. Esses comportamentos são mais comuns em algumas cepas do que em outras, e podem ter efeitos negativos na saúde e impactos nos resultados da pesquisa (GARNER, MASON, 2002).

Os distúrbios neurológicos compreendem uma variedade de condições que afetam o cérebro e o sistema nervoso, incluindo, entre outros, epilepsia e acidente vascular cerebral (AVC). Quando tais distúrbios são induzidos, geralmente ocorrem por meio do uso de várias técnicas experimentais, como manipulação genética, exposição química ou lesão cerebral. O estresse crônico pode prejudicar a função cerebral e levar a condições como depressão, inquietação e tremores. Da mesma forma, a exposição a substâncias tóxicas ou agentes infecciosos pode comprometer as células cerebrais e causar déficits neurológicos.

Em modelos de AVC em camundongos, uma escala neurológica é usada para avaliar as alterações comportamentais gerais e déficits motores focais, sensoriais e de equilíbrio (escala neurológica modificada de DiSimoni). Para a avaliação de déficits gerais, os animais são inicialmente analisados em bancada aberta, isto é, sem a manipulação do observador, e alguns aspectos são observados, como a reação a ruídos (pela posição das orelhas), aspectos dos olhos e atividade (apatia e letargia). A reação de postura e equilíbrio é realizada na mão do avaliador, que inclina a palma da mão levemente, e, durante o movimento de balanço, o animal deve usar seus membros para se estabilizar. Para a avaliação de déficits focais são considerados, dentre outros aspectos, a simetria corpórea; a marcha; escalada em ângulo de 45º; movimento circular (animal suspenso pela cauda); simetria de membro anterior (comportamento de segurar com as patas dianteiras); e movimento circulatório obrigatório (ato de empurrar o animal lateralmente) (DONATH *et*

al., 2016).

Como alguns distúrbios neurológicos podem estar associados ao ambiente cativo pouco estimulante, e não somente à condição experimental, é importante o fornecimento de itens de enriquecimento ambiental para prevenir determinados comportamentos. Mesmo que o enriquecimento ambiental não possa reverter comportamentos estereotipados estabelecidos, o fornecimento dos itens pode levar a uma melhor validade e confiabilidade experimental.

4 | PARÂMETROS FISIOPATOLÓGICOS

a. Peso e condição corporal

Dentre os parâmetros mensuráveis, o de maior importância clínica é o peso, que, à primeira vista, parece ser uma métrica fácil de avaliar de forma objetiva e pode fornecer informações importantes sobre o ponto final humanitário. No entanto, a interpretação da perda de peso corporal no contexto de avaliação do agravamento de uma condição constitui um desafio que precisa levar em conta que o apetite, a ingestão de alimentos e o desenvolvimento do peso corporal são regulados de forma complexa. A interpretação da perda de peso é ainda mais difícil pelo fato de ser um sinal para várias condições associadas, como a redução do apetite, alterações metabólicas, aumento de gasto energético, má absorção ou cronicidade de uma doença.

Alguns comitês internacionais de cuidado e uso de animais adotam a recomendação de considerar a eutanásia para animais que perderam de 15 a 20% do seu peso corporal basal. Em estudos de irradiação, o valor preditivo positivo de uma perda de peso de 15% ou 20% para morte foi de 93,0% ou 97,1%, respectivamente (NUNAMAKER *et al*., 2013). No entanto, existem problemas práticos com a aferição do peso, que pode não fornecer uma medida precisa dos depósitos de gordura e da massa muscular, pois esta pode ser mascarada se a perda de peso for encoberta pelo crescimento de um tumor, aumento de órgãos ou acúmulo de líquido intraperitoneal.

Os pontos finais humanitários baseados em perda de peso rápida (ao longo de alguns dias) ou gradual em relação ao peso inicial são fáceis de adotar e são amplamente aplicados. No entanto, os parâmetros baseados no peso podem ser mascarados em modelos de doença aguda, como choque circulatório, devido ao rápido agravamento da condição do animal que pode preceder a perda de peso (NEMZEK *et al.,* 2004).

Para combater a incerteza na avaliação do peso corporal como parâmetro individual no ponto final humanitário, deve-se aplicar essa métrica em combinação com outros critérios clínicos adicionais, levando a um maior valor preditivo de morbidade ou mortalidade. Com isso, a decisão pela eutanásia não deve ser baseada apenas em uma porcentagem arbitrária de mudança de peso corporal, devendo sempre considerar outros parâmetros indicativos de dor e considerações específicas do modelo animal (MEI *et al*., 2019).

Em muitos casos, a condição corporal pode ser analisada em detrimento da mensuração do peso corporal. A pontuação da condição corporal de roedores é um método não invasivo para avaliar o estado de saúde e estabelecer parâmetros para os animais, em que o peso corporal não é uma ferramenta viável de monitoramento, como em modelos de tumor, produção de ascite e gravidez, ou para animais jovens em crescimento. Os escores de condição corporal (ECC) variam de 1 (emagrecimento) a 5 (obesidade). As pontuações são determinadas por exame visual, realizado pela observação da quantidade de massa corporal que cobre as protuberâncias ósseas na região pélvica, e por meio da palpação realizada sobre os ossos sacroilíacos (ULLMAN-CULLERE; FOLTZ, 1999). Uma ECC 2 – subcondicionada ou inferior - requer avaliações complementares para que seja realizada a intervenção clínica necessária e estabelecimento do ponto final humanitário mais apropriado.

b. Desidratação

Em um animal hidratado, a pele pressionada no dorso retorna rapidamente à sua posição normal após ser solta (turgor cutâneo). Em um animal desidratado, a pele demora a voltar ao normal ou permanece esticada. A desidratação pode aparecer pela incapacidade do animal em deambular até a fonte alimentar/hídrica, pode também estar associada à doença em geral (perda excessiva de fluidos) ou ter uma causa mais específica, como obstrução do trato digestivo ou anormalidades na dentição. Todas as possibilidades precisam ser levadas em consideração na hora da avaliação clínica. Animais idosos, muito jovens, obesos ou magros podem apresentar respostas alteradas no teste de turgor cutâneo.

c. Frequências respiratórias e cardíacas

Outros parâmetros fisiológicos mensuráveis, como as frequências respiratórias e cardíacas, são importantes indicadores de avaliação em estudos de segurança e toxicológicos. A pletismografia é um método não invasivo mais utilizado para monitorar a função respiratória, porém em alguns equipamentos o animal precisa estar contido, o que pode ser estressante. Já o monitoramento da frequência respiratória pela observação dos movimentos respiratórios pode ser difícil devido à alta frequência basal dos camundongos (80–230 movimentos respiratórios por minuto) e oferece apenas um dado instantâneo que pode ser influenciado pela hora do dia e pelo observador.

Aumentos na frequência respiratória de 1,3 a 1,5 vezes foram empregados como referência objetiva para finalização humanitária em modelo de câncer de pulmão, sinalizando a necessidade de intervenção clínica ou eutanásia (WINN *et al.*, 2021).

A avaliação da condição pulmonar pode ser baseada nos sinais clínicos obtidos através de observações subjetivas como, por exemplo, dispneia, taquipneia, respiração

superficial ou abdominal. A taxa de respiração e profundidade não são fáceis de avaliar em camundongos sem equipamento especializado, no entanto, animais com a respiração superficial ou rápida podem ser um indicador de agravamento da condição clínica. Portanto, dificuldades respiratórias graves ou contínuas são fortes indicadores para aplicação de pontos finais humanitários (GRAF *et al.*, 2016).

Os impulsos dolorosos ascendentes levam à ativação hipotalâmica e ao aumento da atividade do sistema simpático-adrenérgico. Essa ativação resulta em efeitos cardiovasculares substanciais, como alterações na frequência cardíaca. A resposta de curto prazo da frequência cardíaca medida por telemetria tem sido descrita como um método para estudar as propriedades analgésicas de compostos farmacêuticos em um modelo de dor visceral em ratos, e o método de monitoramento contínuo da frequência cardíaca foi capaz de identificar sinais de dor de grau leve a moderado em camundongos, que não poderiam ser claramente detectados de outra forma em tempo real (ARRAS *et al.*, 2007).

d. <u>Temperatura corporal</u>

A hipotermia não transitória tem sido sugerida como um preditor potencialmente útil de morte em alguns modelos de infecção experimental. A hipotermia comumente se instala quando a doença atinge um estágio de agravamento, e a temperatura corporal ou o monitoramento telemétrico pode constituir um importante refinamento dos pontos finais humanitários, particularmente se pontuados com outros parâmetros clínicos (WARN *et al.*, 2003).

A temperatura corporal é um sinal vital objetivo e diminui ao longo do tempo de maneira dependente da gravidade em determinados modelos de doenças, sendo um preditor robusto de óbito iminente. Estudos demonstraram que as temperaturas central e superficial podem ser usadas para refinar o ponto final humanitário. Os valores de corte para eutanásia variam substancialmente entre os projetos e entre o método de aferição da temperatura (sonda retal, termômetro infravermelho, chips subcutâneos).

Os estudos envolvendo mensurações de temperatura central e superficial em camundongos demonstraram que a temperatura da superfície é, em média, 2,57°C, 3–4°C ou 2–3°C abaixo da temperatura central, dependendo do local da aferição e das contenções aplicadas (esterno, dorso sem contenção e dorso com contenção, respectivamente), e há moderada a forte correlação entre as temperaturas central e superficial durante a hipotermia (HANKENSON *et al.*, 2013).

Um fator importante que contribui para as diferenças de temperatura absoluta entre a temperatura central e a de superfície é a temperatura ambiente. Quanto mais baixa a temperatura ambiente, menor a temperatura da superfície do animal, enquanto as respostas termorreguladoras mantêm a temperatura central constante. Outro fator que contribui para divergências entre a temperatura central e superficial é o manuseio

do animal. Dispositivos de contenção podem elevar a temperatura corporal em segundos após a contenção de um camundongo, resultado da ativação do sistema nervoso simpático com aumento da termogênese e da vasoconstrição dos vasos da pele. Porém, ambos os métodos de aquisição de dados de temperatura (central e superficial) são adequados como fator preditivo de óbito. A termometria infravermelha pode servir como uma alternativa confiável em detrimento de sistemas baseados em transponders implantáveis (MEI *et al*., 2018).

A diminuição da temperatura corporal de 4 a 6°C abaixo do normal foi correlacionada com o óbito iminente em diversos modelos de doenças. Estudos de camundongos infectados com bactérias (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *epidermidis*) indicaram que uma hipotermia de 34°C (4,5°C abaixo do normal) foi preditivo de mortalidade (SOOTHILL *et al*., 1992), enquanto a temperatura de 3 a 4ºC abaixo do normal (37,5ºC) foi preditivo de morte em animais infectados com vírus influenza (WONG *et al*., 1997).

A hipotermia pode ser um desfecho eficaz para doenças infecciosas agudas, particularmente quando as medições são feitas com maior frequência, sendo preditor de óbito em modelos de infecção experimental, mas são necessários estudos adicionais em modelos que não sejam em doenças infecciosas. Se a hipotermia for usada como ponto final humanitário, os valores de corte devem ser determinados para cada modelo quando a intenção for antever o óbito.

5 | PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E MOLECULARES

A avaliação de proteínas de fase aguda (PFA), catecolaminas, corticosteroides e hormônios como insulina, glucagon e prolactina são importantes parâmetros bioquímicos que, em conjunto com os parâmetros comportamentais e patofisiológicos, podem ser utilizados como critérios de decisão para o ponto final humanitário. Esses parâmetros podem fornecer informações precoces valiosas sobre o progresso das mudanças fisiológicas, quando características hormonais, enzimáticas, imunológicas e hematológicas se desviam significativamente de uma faixa normal. Podem ser realizados em amostras de sangue, urina, saliva, fezes, líquido lacrimal e assim por diante.

Embora as catecolaminas e os corticosteroides possam ser úteis na avaliação da resposta fisiológica ao estresse em animais de laboratório, não são recomendados como um preditores únicos (LITTIN *et al*., 2008). As catecolaminas podem aumentar a frequência cardíaca, a pressão arterial e a frequência respiratória, porém, essas respostas nem sempre são indicativas de dor ou distresse nos animais. No geral, embora as catecolaminas possam fornecer algumas informações sobre a resposta fisiológica ao estresse em camundongos, elas não devem ser usadas como um único preditor de ponto final humanitário, e outros indicadores de bem-estar do animal, como sinais clínicos, comportamentais e peso corporal devem ser usados em conjunto para determinar quando a intervenção clínica será

necessária.

As PFA são úteis na previsão de ponto final humanitário em camundongos, pois refletem a gravidade da condição do animal. Quando um animal é submetido a um procedimento estressante, como uma cirurgia ou exposição a uma substância tóxica, as PFA aumentam em resposta ao dano tecidual e à inflamação. Níveis altos de PFA podem ser indicativos de distresse ou dor e a eutanásia pode ser justificada. Várias PFA foram estudadas em camundongos como preditores de pontos finais humanitários, incluindo proteína C reativa (PCR), amiloide sérica A e haptoglobina (CRAY; ZAIAS; ALTMAN, 2009).

A regulação dos genes pode indicar sinais precoces de dor e/ou distresse nos animais experimentais. A seleção de um marcador molecular que permite identificar as alterações fisiológicas precoces indicativas de dor pode ser um preditor importante do ponto final humanitário. Ao selecionar um marcador molecular, os pesquisadores podem intervir e minimizar os danos aos animais antes do seu agravamento, porém, é importante considerar a especificidade e a sensibilidade do marcador. O marcador deve ser específico para o processo fisiológico em estudo e não deve ser afetado por fatores como estresse, dieta ou outras intervenções experimentais.

As novas tecnologias inovadoras, como transcriptômica e proteômica, permitem estudar o efeito dos compostos-teste no nível molecular, detectando alterações no genoma. Por exemplo, a carcinogênese induzida quimicamente pode estar associada à regulação de um agrupamento de genes específicos, e estes podem ser monitorados para fornecer uma indicação precoce da indução do tumor (HOWARD, NEVALAINEN, PERRETTA, 2016).

6 | USO E INTERPRETAÇÃO DE UM SISTEMA DE PONTUAÇÃO

Ao projetar um experimento, o pesquisador deve especificar claramente o resultado experimental que deseja alcançar e os critérios específicos que permitirão o reconhecimento de quando os resultados experimentais foram alcançados. Além disso, deve-se identificar quaisquer efeitos adversos potenciais e os momentos em que a dor ou o distresse podem ocorrer. Os potenciais efeitos adversos podem ser baseados em publicações, experiências prévias e comunicação com os demais colegas da área. Se estes não forem confiáveis ou faltarem evidências, uma abordagem antropomórfica crítica pode ser adotada; ou seja, avaliar qual o impacto do procedimento em um humano, deduzir os sinais e então ajustá-los à luz da biologia do modelo experimental (MORTON, 1999). Alguns sinais podem ser comuns a todos os animais, por exemplo, diminuição da atividade, redução de consumo alimentar e hídrico e assim por diante. Essa fase é importante para que se possa determinar os sinais clínicos e estabelecer critérios para o ponto final humanitário. As tecnologias não invasivas, incluindo imagem, avaliação comportamental ou monitoramento fisiológico (por exemplo, por biotelemetria), podem ser úteis para reconhecer quando os resultados experimentais foram alcançados (LITTIN, *et al.*, 2008).

Um bom planejamento do projeto é necessário para determinar uma classificação de gravidade prospectiva adequada e desenvolver critérios de monitoramento e avaliações observacionais apropriadas e pontos finais humanitários adaptados ao estudo. Um sistema de avaliação ideal deverá incluir avaliações simples e objetivas que possam ser aplicadas de forma consistente, sendo usadas para detectar o início da dor e para monitorar seu desenvolvimento. Um sistema único de avaliação não está disponível, devido à grande variação de comportamentos e respostas entre as diferentes espécies, linhagens e animais individuais e as especificidades dos procedimentos experimentais. O emprego de sistemas de avaliação personalizados específicos para os projetos pode contribuir para refinamentos em modelos animais experimentais. Assim, é importante listar as respostas comportamentais ou sinais clínicos possíveis ou observados, quantificando ou pontuando sempre que possível, permitindo a identificação do ponto final humanitário.

Antes da identificação dos parâmetros relevantes para a determinação do ponto final humanitário, alguns aspectos devem ser verificados, como: identificação e avaliação de potenciais efeitos adversos e validação dos pontos finais humanitários selecionados. Dependendo do experimento, os pontos finais idealmente devem satisfazer os seguintes critérios: fácil de monitorar; reprodutível; não trabalhoso; predição válida da progressão da doença; relevante (equivalente) e robusto (pouca variação); redução máxima da dor e desconforto (HENDRIKSEN E MORTON,1999).

O desenvolvimento de um sistema de monitoramento deve ser direcionado para um animal individual e não para um grupo de animais experimentais. Além disso, o nível de dor ou desconforto experimentado por cada animal precisa ser relatado, podendo ser usadas as categorias leve, moderada ou grave. É importante salientar que o uso de medidas objetivas para avaliar o nível de dor ou distresse experimentados pelo animal durante o procedimento deve capturar quaisquer questões relacionadas ao bem-estar, esperadas e inesperadas, que ocorram durante o curso do projeto e quaisquer ações de refinamento que foram tomadas no momento. Muitos dos sistemas publicados defendem alguma forma de sistema de pontuação numérica e classificam os sinais clínicos de acordo com seu agravamento. Evidentemente, a experiência e o julgamento profissional permitirão uma melhor pontuação objetiva.

As fichas de pontuação devem ser cuidadosamente construídas em consulta com todos os envolvidos no cuidado dos animais, e devem ser reavaliadas e modificadas com base em observações realizadas durante um estudo-piloto, de modo a identificar ações que possam refinar o procedimento ou estabelecer desfechos precoces e, assim, permitir uma intervenção mais rápida.

Os sinais clínicos cardinais podem ser apresentados em função do tempo e, essencialmente, todos os sinais clínicos devem ser descritos de uma forma que reduza a variação na interpretação do observador, podendo ser apenas como presente (+) e ausente (–), por exemplo. Outra forma de avaliação pode ser desenvolvida através de

uma pontuação objetiva, atribuindo um peso para cada um dos sinais de desconforto em uma escala, variando do normal ao nível mais alto de agravamento. Desta forma, obtém-se uma pontuação total que indica a extensão do desvio da normalidade e pode ser usada para iniciar uma ação como, por exemplo, tratamento médico. Além disso, é importante definir o limite aceitável ou permissível para determinado experimento, por exemplo, uma pontuação máxima de sinais/comportamentos clínicos que não devem ser excedidos (HOWARD, NEVALAINEN, PERRETTA, 2016).

O uso de pontuações para critérios variáveis e diferentes entre si pode melhorar a acurácia de uma avaliação clínica-comportamental em animais. A ideia é que, ao atribuir uma pontuação para cada critério, é possível combinar várias informações para produzir uma medida resumida que seja mais representativa do estado geral do animal ou da gravidade de sua condição. Em muitos casos, as pontuações são usadas em escalas, em que cada pontuação corresponde a uma determinada categoria ou nível de gravidade. É importante garantir que cada critério tenha um peso apropriado em relação aos demais e que a combinação das pontuações forneça uma medida válida e confiável. Além disso, é importante considerar a relevância clínica de cada critério e como eles se relacionam com o protocolo experimental. Nas fichas numéricas, uma série de sinais clínicos, indicadores físicos e parâmetros comportamentais podem ser avaliados através de uma pontuação de acordo com sua gravidade aparente. Por exemplo, zero para não afetado, ‘1’ para desvio leve, ‘2’ para desvio moderado e ‘3’ para desvio substancial. As pontuações são somadas e os resultados são usados para determinar a ação necessária, como analgesia, de acordo com as ações predeterminadas no projeto.

A frequência com que os animais afetados devem ser observados deve ser determinada para cada estudo, e o intervalo entre as observações dependerá do curso de tempo esperado ou conhecido da condição. Por exemplo, em alguns casos experimentais de infecções/toxicidade, observações muito mais frequentes (por exemplo, a cada hora) podem ser necessárias. Agendar o estudo para que o período crítico para os animais ocorra durante o horário normal de trabalho (quando as luzes estão acesas na sala dos animais) pode ajudar a garantir que as observações apropriadas sejam feitas (MORTON, TOWNSEND, 1995).

Qualquer que seja o sistema de registro escolhido, este deve ser adaptado para estudos específicos e, em seguida, revisado e modificado regularmente com o uso, se necessário. Não se deve presumir que qualquer sistema de avaliação de bem-estar seja infalível. Sempre existe a possibilidade de ocorrência de efeitos adversos inesperados, ou de um avaliador mais experiente detectar sinais clínicos muito sutis e não reconhecidos anteriormente. O equilíbrio é essencial entre a busca pela objetividade na avaliação do bem-estar, por um lado, e a confiança no julgamento de indivíduos experientes, por outro.

7 | VALIDAÇÃO E IMPLEMENTAÇÃO DE UM SISTEMA DE PONTUAÇÃO

Evitar ou minimizar a dor na pesquisa com animais é uma obrigação de todos os pesquisadores, por razões morais ou éticas. A identificação e validação de parâmetros para identificação dos pontos finais humanitários devem ser consideradas, mas esse não é um processo fácil nem simples.

Os conceitos-chave do desenvolvimento de qualquer escala são validade e confiabilidade. A validação e o monitoramento são necessários para garantir uma previsibilidade robusta do ponto final humanitário sem interferência com os objetivos científicos. Em muitos estudos, a dor e o desconforto podem ser evitados pela identificação de critérios clínicos e comportamentais que ocorrem antes de qualquer agravamento da condição clínica do animal. As pessoas envolvidas no estabelecimento e validação de parâmetros em experimentos devem ser estimuladas a apresentar e publicar os dados, para apoiar os esforços de refinar continuamente as práticas de uso de animais que ocorrem na pesquisa biomédica.

Os estudos-piloto são inestimáveis para a determinação de pontos finais humanitários precoces em um pequeno grupo de animais. Estes são uma maneira eficaz de reduzir os impactos negativos, evitando dores e desconfortos desnecessários para um número maior de animais. Os estudos-piloto podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias para lidar com a condição de agravamento da condição de saúde de um animal, e tais estratégias podem incluir o ajuste de dose, alterações no tamanho da amostra, identificação de efeitos adversos, inclusão de refinamentos como uso de analgésicos e modificações nos procedimentos ou alteração na duração da exposição do animal a determinado patógeno ou substâncias, a fim de minimizar os impactos negativos sobre os animais (NRC, 2008).

Dado o amplo escopo de procedimentos e objetivos da pesquisa com animais, nenhuma referência única pode documentar todos os pontos finais humanitários para cada protocolo de pesquisa. Portanto, devem ser realizados estudos para identificar os pontos finais humanitários apropriados para cada um. É necessário que os pesquisadores validem os pontos finais quanto à integridade, objetividade e reprodutibilidade do estudo. Uma boa comunicação entre pesquisadores, equipe veterinária, equipe de cuidados com animais e a CEUA é fundamental para garantir o melhor resultado, tanto para o bem-estar dos animais quanto para os objetivos do estudo nesses programas de pesquisa.

8 | MEDIDAS DE CUIDADO E SUPORTE

Quando um ponto final humano é alcançado, o experimento deve ser interrompido imediatamente para evitar um agravamento da condição fisiológica, podendo envolver a eutanásia do animal ou o fornecimento de tratamento médico adequado para aliviar a dor e o desconforto.

O uso de cuidados de suporte deve ser meticulosamente considerado, pois auxilia as necessidades físicas básicas de um animal para que ele possa responder plenamente a insultos externos. Exemplos incluem o fornecimento de um ambiente aquecido (calor suplementar ou temperaturas ambientais aumentadas); fluidos parenterais; suporte nutricional, como fontes nutricionais de alta qualidade e de fácil acesso e digestão; e alterações nas gaiolas, incluindo materiais de cama ou nidificação alternativos para conforto e regulação da temperatura e o fornecimento de locais para abrigo. O efeito potencial de fornecer cuidados de suporte não deve ser subestimado, e sua possível influência nos resultados experimentais deve ser avaliada criticamente, como é feito para intervenções farmacológicas.

As estratégias para o manejo da dor e do desconforto podem incluir considerações não farmacológicas, como as citadas acima, intervenções farmacológicas ou eutanásia. A estratégia escolhida varia conforme a espécie, os procedimentos realizados, a duração da ação necessária, a via de administração preferida, o grau e o tipo de analgesia necessária e a pesquisa realizada (HAWKINS *et al.*, 2011).

É importante lembrar que, além dos pontos de intervenção humana antecipados, pode haver resultados inesperados (por exemplo, doença não relacionada, falha nos sistemas de suporte à vida, efeitos adversos inesperados). Estes podem ou não estar relacionados ao procedimento científico específico e podem justificar intervenções antes que os objetivos científicos sejam alcançados. Os pesquisadores e toda equipe de monitoramento do bem-estar precisam ser qualificados, flexíveis e adaptáveis para garantir que os pontos de intervenção sejam aplicados nessas circunstâncias.

Intervenções adequadas, quando os principais sinais aparecem ou atingem um nível limiar, devem ser definidas no momento em que os indicadores são discutidos. Por exemplo, fluidoterapia pode ser iniciada assim que os sinais de desidratação aparecerem, ou uma intervenção para perda de peso pode ser feita com o fornecimento de alimentos ao nível do chão (de preferência úmidos) (Figura 4).

Dentre as principais intervenções, podemos destacar, entre outras: aumento da frequência de observação de animais; modificação das práticas de alojamento e manejo para melhorar o conforto dos animais; tratamento veterinário, incluindo analgesia e/ou terapia de suporte; modificação dos procedimentos experimentais para minimizar o desconforto; interrupção de curto prazo de procedimentos dolorosos/estressantes; término permanente de procedimentos dolorosos/estressantes, ou seja, remoção dos animais do estudo e eutanásia. Quando forem identificados indicadores de dor, os analgésicos devem ser administrados na dose e por vias apropriadas para o estudo e para a espécie, e se houver a necessidade de eutanásia, os métodos usados devem ser os mais apropriados.

À luz das evidências científicas atuais, o Conselho Canadense de Cuidados com Animais expandiu o reconhecimento do impacto dos procedimentos científicos prolongados ou repetitivos em animais individuais, por exemplo, isolamento social,

marcação para identificação ou ambiente pouco estimulante, denominandos como ‘pontos finais cumulativos’ (CCAC, 2022). Os pontos finais cumulativos são os pontos em que os animais individuais devem ser considerados como tendo atingido o envolvimento máximo de sua vida em atividades científicas. Considera-se que um animal atingiu um ponto final cumulativo quando atingiu um limite em termos da quantidade total de impacto no bem-estar que experimentou (NUNAMAKER *et al.*, 2021). No ponto final cumulativo, entende-se que os animais não devem ser mantidos indefinidamente sem um propósito claro e um plano definido, e seu uso prospectivo deve ser revisado periodicamente, para garantir que não sejam mantidos desnecessariamente.

Assim, segundo Fenwick e Griffin (2013), dentro dos princípios dos 3R’s, o refinamento deve ser priorizado sobre a redução: os animais não devem ser usados além de seus pontos finais cumulativos simplesmente para reduzir o número total de animais empregados, e o custo ou a conveniência não devem ser usados como justificativas ao decidir sobre parâmetros cumulativos.

Figuras

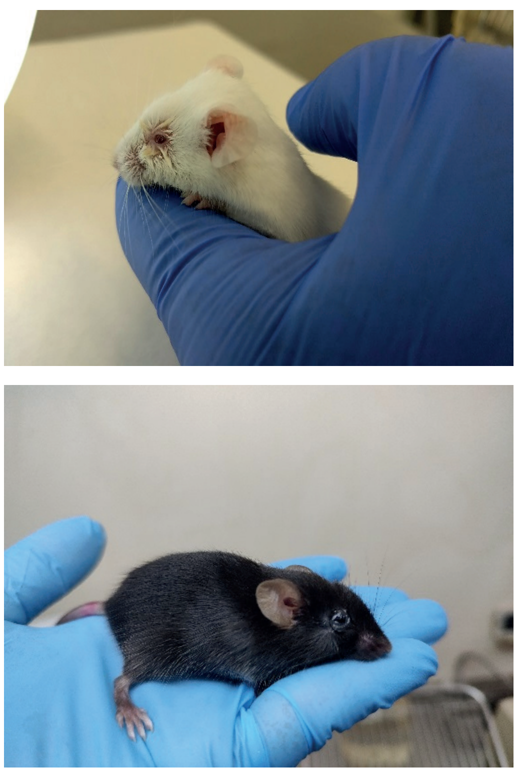


Figura 1: Aparência dos olhos e descarga ocular

Fonte: Monique Lima, CEA/IOC, 2021.

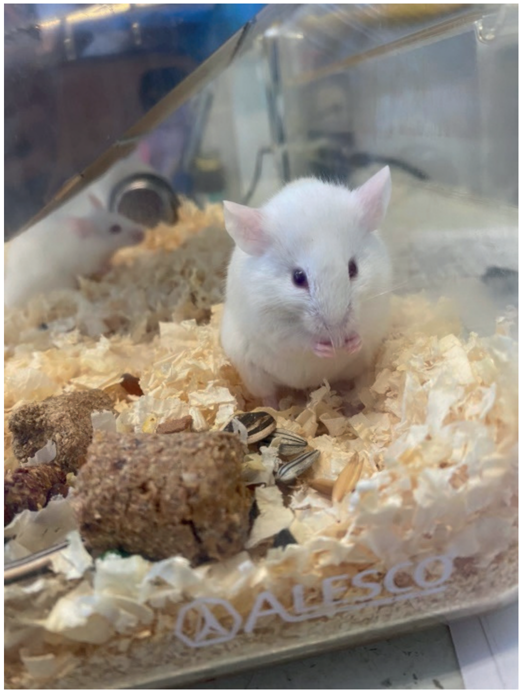


Figura 2: Autolimpeza

Fonte: Monique Lima, CEA/IOC, 2021.



Figura 3: Alopecia por barbeamento

Fonte: Monique Lima, CEA/IOC, 2021



Figura 4: Fornecimento da alimentação de forma facilitada

Fonte: Monique Lima, CEA/IOC, 2021.

9 | REPERTÓRIO DE AVALIAÇÃO

SINAL OU COMPORTAMENTO	COMENTÁRIOS	AVALIAÇÃO
Postura anormal	A postura curvada é um sinal geral de dor ou doença.	• Não curvado • Encurvado de forma intermitente • Encurvado permanentemente
Alterações na atividade em grupo	As atividades sociais podem ser afetadas pela dor e/ou o curso da doença.	• Interação com os pares, movimentos e comportamentos típicos da espécie, curioso, responsivo, padrões normais de comportamento provocados (por exemplo, reação de fuga, ao se aproximar) • Interrupções na atividade, padrões de comportamento moderados, mesmo quando provocados, ingestão reduzida de alimentos • Sem resposta, letárgico, sem ingestão de comida
Mudanças na atividade/ mobilidade	A diminuição da mobilidade pode ser localizada na área da dor (por exemplo, membro) ou pode ser generalizada. Roedores com dor geralmente têm atividade diminuída, mas atividade aumentada também pode ser observada. Outros comportamentos anormais incluem arquear dorso, contração da região abdominal e cambalear.	• Locomoção espontânea sem ser provocada, ou durante o sono, após abertura da gaiola e provocação • Locomoção após ser provocada, cambaleante, ataxia, marcha difícil • Sem locomoção

Alterações na expressão facial	A utilização de uma escala de caretas pode ser benéfica na identificação da dor. As expressões faciais podem ser escalonadas por evidência em fotografias, gravações de vídeo digital ou ao vivo.	Escalas de caretas: • Estreitamento/fechamento dos olhos • Protuberâncias nasais e de bochechas • Posicionamento das orelhas • Mudanças na posição e forma das vibrissas Escalas de abertura dos olhos • Abertura > 75% • Abertura de 50% a 75% • Abertura de 25% a 49% • Abertura de < de 25%
Diminuição da temperatura corporal	Animais que sentem frio ao toque provavelmente estão gravemente hipotérmicos e podem estar em estado moribundo. Avaliações de temperatura central e de superfície podem ter variações.	Hipertermia > de 3ºC da temperatura normal Hipotermia < 3ºC da temperatura normal
Diminuição da ingestão de alimentos e/ou água	Pode estar associada à perda de peso, desidratação e diminuição da produção de urina/fezes. Tensão de pele prolongada indica desidratação. A pontuação da condição corporal pode ser mais útil do que o peso corporal em algumas circunstâncias.	• Sem alteração de peso • Perda de 5-10% • Perda de 11-15% • Perda de 16-19% • Perda de > 20% • Turgor da pele normal • Turgor cutâneo reduzido (dobra cutânea persistente)
Diminuição do *grooming*, piloereção	A pelagem parece desalinhada, os pelos podem estar arrepiados.	• Pelagem brilhante, justo ao corpo/ Asseio normal • Pelagem brilhante, piloereção parcial/ Higiene reduzida, região anal manchada • Pelagem alterada e sem brilho, piloereção acentuada/ Sem higiene, região anal manchada e incrustada
Diminuição da construção do ninho	Particularmente significativo em camundongos, que têm um forte impulso para construir ninhos, podendo ser um sinal de alterações expressivas no bem-estar. A ferramenta de avaliação de complexidade de ninho pode ser empregada.	• Ninho complexo • Ninho plano, paredes mais altas que os camundongos • > de 80% material de ninho usado, ninho perceptível • > de 80% material de ninho usado, ninho manipulado • Material de ninho levemente manipulado • Material de ninho não manipulado
Diminuição da resposta à estimulação externa	Tentativas de fuga quando manuseadas são normais em roedores, a menos que estejam bem habituados a manusear - a falha em exibir esse comportamento pode indicar dor ou angústia.	• Avaliação de déficits gerais em bancada aberta: reação a ruídos e atividade (apatia e letargia) • Reação de postura e equilíbrio • Avaliação de déficits focais: simetria corpórea; marcha; escalada em ângulo de 45º; movimento circular; simetria de membro anterior e movimento circulatório obrigatório
Frequências respiratórias e cardíacas	Os impulsos dolorosos levam à ativação hipotalâmica e ao aumento da atividade do sistema simpático-adrenérgico. Essa ativação resulta em efeitos cardiovasculares substanciais. A pletismografia pode ser utilizada para monitorar a função respiratória.	• Taquipneia ou padrão anormal de respiração (superficial, abdominal) • Aumento da frequência cardíaca

10 | ILUSTRAÇÃO DAS ESCALAS DE EXPRESSÃO FACIAL EM CAMUNDONGOS E RATOS (*THE MOUSE GRIMACE SCALE* E *THE RAT GRIMACE SCALE*)

a. <u>Escala de Expressão Facial em camundongos</u>



Fonte: Escala de expressão facial de camundongos de Langford *et al.*, 2010. Imagens Dr. Jeffrey Mogil, (*McGill University*). Este pôster e mais informações estão disponíveis no NC3R's (*National Centre for the 3R's in the UK*).

b. Escala de Expressão Facial em ratos



Fonte: Escala de expressão facial de ratos de Sotocinal *et al.*, 2011. Imagens Dr. Jeffrey Mogil, (*McGill University*). Este pôster e mais informações estão disponíveis no NC3R's (*National Centre for the 3R's in the UK*).

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, M. L.; D'ALMEIDA, V.; KO, G. M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P. J. F. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo; 2004. 166p.

ARRAS, M.; RETTICH, A.; CINELLI, P.; KASERMANN, H. P.; BURKI, K. Assessment of post-laparotomy pain in laboratory mice by telemetric recording of heart rate and heart rate variability. **BMC Vet Res**. 2007, Aug 2;3:16.

BAKER, H.; LINDSEY J.; WEISBROTH, S. The Laboratory Rat. **New York: Academic Press**, 1979.

BRASIL. Concea, RN25. **Baixa o Capítulo "Introdução Geral" do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais para Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal** – CONCEA, 2015.

CCAC guidelines: Identification of scientific endpoints, humane intervention points, and cumulative endpoints. Date of Publication: March 2022. **Canadian Council on Animal Care**, 2022. ISBN: 978-0-919087-95-8.

CRAY, C.; ZAIAS, J.; ALTMAN, N. H. Acute phase response in animals: a review. **Comp Med.** 2009 Dec; 59(6):517-26.

DONATH, S.; AN, J.; LEE, S. L. L.; GERTZ, K.; DATWYLER, A. L.; HARMS, U.; MÜLLER, S.; FARR, T. D.; FÜCHTEMEIER, M.; LÄTTIG-TÜNNEMANN, G.; LIPS, J.; FODDIS, M.; MOSCH, L.; BERNARD, R.; GRITTNER, U.; BALKAYA, M.; KRONENBERG, G.; DIRNAGL, U.; ENDRES, M.; HARMS, C. (2016). Interaction of ARC and Daxx: A novel endogenous target to preserve motor function and cell loss after focal brain ischemia in mice. **J Neurosci** *36*, 8132-8148.

FENWICK, N.; AND GRIFFIN, G. (2013) **Balancing reduction and refinement**. Alternatives to Laboratory Animals 41(3):P33-P35.

GARNER, J. P.; MASON, G. J. Evidence for a relationship between cage stereotypies and behavioural disinhibition in laboratory rodents. **Behavioural Brain Research**, Volume 136, Issue 1, 2002, Pages 83-92.

GARNER, J. P. Stereotypies and other abnormal repetitive behaviors: potential impact on validity, reliability, and replicability of scientific outcomes. **ILAR** J. 2005; 46(2):106-17.

GASKILL, B. N.; GORDON, C. J.; PAJOR, E. A.; LUCAS, J. R.; DAVIS, J. K.; GARNER, J. P. 2013. Impact of nesting material on mouse body temperature and physiology. **Physiol Behav** 110-111:87–95.

GRAF, R.; CINELLI, P.; ARRAS, M. Morbidity scoring after abdominal surgery. **Laboratory Animals**. 2016;50(6):453-458.

HANKENSON, F. C.; RUSKOSKI, N.; VAN SAUN, M.; YING, G. S.; OH, J.; FRASER, N. W. (2013). Weight loss and reduced body temperature determine humane endpoints in a mouse model of ocular herpesvirus infection. **Journal of the American Association for Laboratory Animal** Science 52, 277-285.

HAWKINS, P.; MORTON, D. B.; BURMAN, O.; DENNISON, N.; HONESS, P.; JENNINGS, M.; LANE, S.; MIDDLETON, V.; ROUGHAN, J. V.; WELLS, S.; WESTWOOD, K. A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: eleventh report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. **Laboratory Animals** 2011; 45: 1–13.

HEFFNER, H. E.; HEFFNER, R. S. Hearing ranges of laboratory animals. J**ournal of the American Association for Laboratory Animal Science**. 2007; 46:11-3.

HENDRIKSEN, C. F. M.; MORTON, D. B. (editors). Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research. **Proceedings of the International Conference**; 22–25 November 1998; Ziest, The Netherlands. London: The Royal Society Medical Press; 1999.

HENDRIKSEN, C.; MORTON, D.; CUSSLER, K. (2011). Use of humane endpoints to minimise suffering. In The Cost Manual of Laboratory Animal Care and Use (ed. B. Howard, T. Nevalainen & G. Perretta), pp. 333–353. **Boca Raton**, FL, USA: CRC Press.

HESS, S. E.; ROHR, S.; DUFOUR, B. D.; GASKILL, B. N.; PAJOR, E. A.; GARNER, J. P. Home improvement: C57BL/6J mice given more naturalistic nesting materials build better nests. **J Am Assoc Lab Anim Sci**, 47 (2008), pp. 25-31.

HOWARD, B.; NEVALAINEN, T.; PERRETTA, G. **The COST manual of laboratory animal care and use:** refinement, reduction, and research. CRC Press 2016. https://doi.org/10.1201/b13591

INSTITUTE OF LABORATORY ANIMAL RESEARCH. **Guia para o cuidado e uso de animais de laboratório**. Institute of Laboratory Animal Research. 8ª edição. Porto Alegre: EdiPUCRS, 2014. p. 29-30.

JACOBY, R. O.; FOX, J. G.; DAVISSON, M. Biology and Diseases of Mice. **Laboratory Animal Medicine.** 2002; 35-120.

JIRKOF, P.; FLEISCHMANN, T.; CESAROVIC, N.; RETTICH, A.; VOGEL, J.; ARRAS, M. 2013. Assessment of postsurgical distress and pain in laboratory mice by nest complexity scoring. Lab Anim 47:153–161.

LANGFORD, D.; BAILEY, A.; CHANDA, M.; CLARKE, S. E.; DRUMMOND, T. E.; ECHOLS, S.; GLICK, S.; INGRAO, J.; KLASSEN-ROSS, T.; LACROIX-FRALISH, M. L.; MATSUMIYA, L.; SORGE, R. E.; SOTOCINAL, S. G.; TABAKA, J. M.; WONG, D.; VAN DEN MAAGDENBERG, A. M.; FERRARI, M. D.; CRAIG, K. D.; MOGIL, J. S. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. **Nat Methods 7,** 447–449 (2010).

LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. M. Finalização humanitária. *In*: LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. M.; KO, G. M. **Cuidados e manejo de animais de laboratório.** São Paulo: Atheneu; 2009. p. 603-15.

LITTIN, K.; ACEVEDO, A.; BROWNE, W.; EDGAR, J; MENDL, M.; OWEN, D.; SHERWIN, C.; WÜRBEL, H.; NICOL, C. Towards humane endpoints: behavioural changes precede clinical signs of disease in a Huntington's disease model. **Proc Biol Sci**. 2008 Aug 22;275(1645):1865-74.

MEI, J.; RIEDEL, N.; GRITTNER, U.; ENDRES, M.; BANNEKE, S.; EMMRICH, J. V. Body temperature measurement in mice during acute illness: implantable temperature transponder versus surface infrared thermometry. **Sci Rep**. 2018 Feb 23;8(1):3526.

MEI, J.; BANNEKE, S.; LIPS, J.; KUFFNER, M. T. C.; HOFFMANN, C. J.; DIRNAGL, U.; ENDRES, M.; HARMS, C.; EMMRICH, J. V. Refining humane endpoints in mouse models of disease by systematic review and machine learning-based endpoint definition. **ALTEX**. 2019;36(4):555-571. Epub 2019 Apr 18.

MORTON, D. B.; GRIFFITHS, P. H. M.1985.Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment.**Vet Rec**, 116:431– 436.

MORTON, D. B. & TOWNSEND, P. (1995). Dealing with Adverse Effects and Suffering During Animal. Research. *In*: **Laboratory Animals** - An Introduction for Experimenters, 2nd Edn., (ed. A.A. Tuffery).

MORTON, D. B. Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research. London: The Royal Society Medical Press; 1999. Humane endpoints in animal experimentation for biomedical research: **Ethical, legal and practical aspects**; pp. 5–12.

MORTON, D. B. A systematic approach for establishing humane endpoints. **ILAR** J. 2000;41(2):80–86.

NEMZEK, J. A.; XIAO, H. Y.; MINARD, A. E.; BOLGOS, G. L.; REMICK, D. G. (2004). Humane endpoints in shock research. **Shock** *21*, 17-25.

NRC. National Research Council (US) Committee on Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals. **Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals**. Washington (DC): National Academies Press (US); 2008. PMID: 20669418.

NUNAMAKER, E. A.; ARTWOHL, J. E.; ANDERSON, R. J. & FORTMAN, J. D. Endpoint Refinement for Total Body Irradiation of C57BL/6 Mice. **Comparative Medicine** 63, 7, 2013.

NUNAMAKER, E. A.; DAVIS, S.; O'MALLEY, C.I.; TURNER, P.V. Developing Recommendations for Cumulative Endpoints and Lifetime Use for Research Animals. **Animals** 2021, *11*, 2031.

REINHARDT, V. 2005. Hair pulling: a review. **Lab Anim** 39:361–369.

ROCK, M. L.; KARAS, A. Z, RODRIGUEZ KB, GALLO MS, PRITCHETT-CORNING K, KARAS RH, ARONOVITZ M, GASKILL BN. 2014. The time-to-integrate-to-nest test as an indicator of wellbeing in laboratory mice. **J Am Assoc Lab Anim Sci** 53:24–28.

SIROIS, M. **Medicina de Animais de Laboratório**: Princípios e procedimentos. São Paulo: EditoraRoca, 2007.

SOOTHILL, J. S.; MORTON, D. B.; AHMAD, A. The HID50 (hypothermia-inducing dose50): an alternative to the LD50 for measurement of bacterial virulence. *Int* **J Exp Path** 73:95–98, 1992.

SOTOCINAL, S. G.; SORGE, R. E.; ZALOUM, A.; TUTTLE, A. H.; MARTIN, L. J.; WIESKOPF, J. S.; MAPPLEBECK, J. C.; WEI, P.; ZHAN, S.; ZHANG, S.; MCDOUGALL, J. J.; KING, O. D.; MOGIL, J. S. 2011. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. **Mol Pain** 7:1–10.

TOTH, L. A. Identifying and Implementing Endpoints for Geriatric Mice. **Comp. Med**. 8(6): 439- 451, 2018.

ULLMAN-CULLERÉ, M.; FOLTZ, CHARMAINE. (1999). Body Condition Scoring: A Rapid and Accurate Method for Assessing Health Status in Mice. **Laboratory animal science**. 49. 319-23.

WARN, P. A.; BRAMPTON, M. W.; SHARP, A.; MORRISSEY, G.; STEEL, N.; DENNING, D. W.; PRIEST, T. (2003) Infrared body temperature measurement of mice as an early predictor of death in experimental fungal infections. **Lab Anim** 37: 126–131.

WINN, C. B.; HWANG, S. K.; MORIN, J.; BLUETTE, C. T.; MANICKAM, B.; JIANG, Z. K.; GIDDABASAPPA, A.; LIU, C. N.; MATTHEWS, K. (2021) Automated monitoring of respiratory rate as a novel humane endpoint: A refinement in mouse metastatic lung cancer models**. PLOS ONE** 16(9): e0257694.

WONG, J. P.; SARAVOLAC, E. G.; CLEMENT, J. G.; NAGATA, L. P: Development of a murine hypothermia model for study of respiratory tract influenza virus infection. **Lab Anim Sci** 47:143–147, 1997.

CAPÍTULO 5

DOR E DISTRESSE

Data de aceite: 03/07/2023

Mariana Boechat de Abreu
Universidade Federal do Rio de janeiro, Rio de Janeiro, Brasil
ORCID 0000-0002-4878-2182

1 | INTRODUÇÃO

O princípio dos 3Rs (*replacement*, *refinement and reduction*), desenvolvido originalmente por Russel & Burch (RUSSEL; BURCH, 1959), é utilizado como base para legislações de diferentes países que regulam a utilização de animais para fins didáticos e científicos. Embora apresentem diferenças, a maioria dos requisitos legais, diretrizes não estatutárias ou recomendações sobre o cuidado e uso de animais utilizados em pesquisas compartilham dos mesmos ideais éticos fundamentais, que se baseiam nesses princípios. Portanto, eles podem ser considerados os princípios orientadores globais que servem de base para a harmonização (GUILLÉN; VERGARA, 2018).

O conceito de refinamento se refere a melhorias de alojamento, cuidados e procedimentos, que minimizem dor real ou potencial, sofrimento, estresse ou danos físicos prolongados ou melhora do bem-estar do animal, quando seu uso não pode ser substituído. Já foi comprovado que o refinamento traz benefícios não apenas para os animais, como também para o resultado da pesquisa (BULGER, 1987). Dentro desse contexto, para cada laboratório e procedimento experimental preconizado devem ser elaboradas as medidas de alojamento, analgesia e cuidados adequadas, e, também, critérios de ponto final humanitário que garantam bem-estar e resultados confiáveis.

2 | BASES DA FISIOPATOLOGIA DA DOR E ANALGESIA MULTIMODAL

O componente fisiológico da dor é denominado nocicepção, consiste no processo de transdução, transmissão e modulação dos sinais nervosos gerados em resposta a um estímulo nocivo externo. É um processo fisiológico que resulta na percepção consciente da dor quando o

estímulo é carreado por completo até o córtex cerebral (BOURNE; MACHADO; NAGEL, 2014). A transmissão da dor envolve o sistema nervoso periférico, o sistema nervoso central (SNC) e vários moduladores químicos. É um fenômeno que consiste em um processo de transdução, transmissão e modulação de sinais neurais gerados em resposta a um estímulo nocivo, que resulta em percepção consciente quando transmitido até o final da via de dor, chegando ao cortex cerebral. Essa via pode ser considerada como um grupo de três neurônios: os neurônios de primeira ordem, originados na periferia e que se projetam para a medula espinhal; os neurônios de segunda ordem, que ascendem a medula espinhal; e os neurônios de terceira ordem, que se projetam para o córtex cerebral (KITCHEN *et al.*, 1987; LAMONT; TRANQUILLI; GRIMM, 2000). (Figura 1A).

O termo nocicepção está relacionado com o reconhecimento de estímulos no sistema nervoso central, que se originam em receptores sensoriais (nociceptores) e que fornecem informações relacionadas ao dano tecidual. Os nociceptores são terminações nervosas não-encapsuladas ou livres que se despolarizam e geram um potencial de ação quando estímulos de natureza mecânica, química ou térmica alcançam níveis nociceptivos, isto é, quando ocorre lesão dos tecidos ou ameaças à sua integridade. Na pele, tecido subcutâneo e outros tecidos como periósteo, cápsulas articulares paredes arteriais, músculos e tendões, os nociceptores são particularmente numerosos. Nesses locais, os nociceptores são de três tipos: mecânicos, térmicos e polimodais. Os mecânicos são receptores de alto limiar, ativados por estímulo mecânico intenso ou nocivo. Suas fibras A-delta, mielinizadas e com diâmetro de 3-4 µm, conduzem o impulso numa velocidade de 5-30m/s (HALL; GUYTON, 2011). Os nociceptores térmicos são ativados por temperaturas extremas (>45^{0}C ou <5^{0}C) e suas fibras A-delta também conduzem o impulso numa velocidade de 5-30m/s. Já os nociceptores polimoidais são ativados por estímulos mecânicos, químicos e térmicos de alta intensidade. As fibras nervosas correspondentes a esses receptores são as fibras C, não-mielinizadas, de pequeno diâmetro (<2µm) e que conduzem o impulso mais lentamente (0.5-2m/s) (LAMONT; TRANQUILLI; GRIMM, 2000). Devido a seu maior calibre e mielinização, as fibras A-delta conduzem os impulsos muito mais rápido que as fibras C, de pequeno diâmetro e não-mielinizadas e, consequentemente, são responsáveis pela transmissão da dor aguda ou primeira dor, bem localizada. As fibras C são responsáveis pela transmissão da dor lenta, difusa ou mal localizada (HALL; GUYTON, 2011).

Ao entender os mecanismos fisiológicos da dor, pode-se compreender os diferentes analgésicos em diferentes pontos da via da dor. Por exemplo, na modulação dos impulsos (como os opioides), na interrupção da condução do impulso (anestésicos locais) ou na prevenção da sensibilização do nociceptor que acompanha o processo inflamatório (anti-inflamatórios não-esteroidais). (Figura 1B).

Um conceito importante é o da analgesia multimodal, que preconiza a utilização de diferentes fármacos e técnicas em ação sinérgica e não de um agente isolado (por maior que seja a dose empregada, não possibilita o bloqueio de todas as vias

responsáveis pelo processo das diferentes etapas da fisiopatologia da dor: transdução, transmissão, modulação e percepção do estímulo doloroso) (ACLAM TASK FORCE MEMBERS *et al.*, 2007; HELANDER *et al.*, 2017). Entretanto, no caso do uso de analgésicos para pesquisa biomédica, deve ser avaliado o uso da analgesia multimodal, pois também é importante ter um controle da influência desses fármacos nos resultados experimentais.

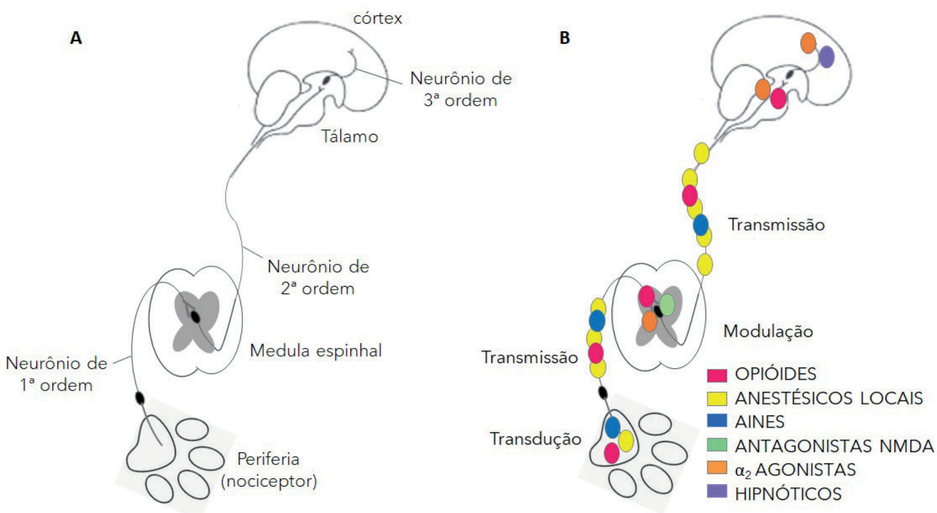


Figura 1. A- Representação esquemática dos componentes responsáveis pela transdução, transmissão, modulação e percepção da dor. B- Representação esquemática dos locais de atuação das diferentes classes de fármacos analgésicos.

Fonte: Mariana Abreu, 2023.

3 | CONTROLE DA DOR TRANSOPERATÓRIA E PLANO ANESTÉSICO

Uma anestesia com plano adequado para realização de uma cirurgia deve possuir três componentes fundamentais: inconsciência, analgesia e relaxamento muscular. Por isso, antes de iniciar qualquer procedimento cirúrgico, deve ser testado o plano anestésico, para se garantir que é adequado.

Após a indução da anestesia geral, são descritos 4 planos anestésicos (Planos de Guedel). Em uma indução adequada, recomenda-se que se passe de forma rápida e imperceptível pelo primeiro e segundo planos (excitação). O terceiro estágio do terceiro plano é caracterizado por inconsciência, relaxamento muscular e analgesia (componentes fundamentais para anestesia cirúrgica); as respostas reflexas motoras estão abolidas. O quarto estágio do terceiro estágio e quarto plano já se caracterizam por anestesia demasiadamente profunda, podendo evoluir para paralisia bulbar e morte. Durante a indução e manutenção da anestesia, parâmetros de profundidade de plano, tais como resposta reflexa motora a estímulos dolorosos, reflexos oculares (avaliação limitada em

roedores e alterações cardiopulmonares devem ser avaliados.

Um método simples, e comumente utilizado, para a avaliação de plano anestésico em roedores e lagomorfos se dá por meio da resposta reflexa motora a um estímulo doloroso supra máximo (tais como pinçamento de cauda ou de prega interdigital), para se avaliar se o animal se encontra em plano anestésico adequado para realização de cirurgia. Tal método se baseia no conhecimento da progressão da abolição de respostas fisiológicas de acordo com o aprofundamento do plano anestésico. Sabe-se que a abolição da resposta motora reflexa ocorre em um estágio imediatamente posterior à abolição da consciência. Assim, ao detectar a ausência de resposta motora reflexa (mais facilmente medida que ausência de consciência), sabe-se que a consciência já foi, anteriormente, abolida, e que, com isso, a dor não pode ser percebida. A resposta de movimento a estímulos nocivos em pacientes humanos anestesiados com propofol foi prevista de forma comparável a partir da avaliação do limiar de reflexo motor por eletromiografia ou do Índice Bispectral (BIS), índice para avaliação de nível de consciência. Considerando suscetibilidade estabelecida do limiar de reflexo motor às influências analgésicas, em protocolos anestésicos que incluam substâncias analgésicas, seu uso poderia ser considerado vantajoso frente ao uso do BIS (JAKUSCHEIT *et al*., 2017; VON DINCKLAGE *et al.*, 2009).

De acordo com Arras e colaboradores (2001), o indicador de resposta motora mais sensível para a tolerância cirúrgica parece ser o reflexo de retirada do podal - foi o último reflexo a desaparecer e o primeiro a retornar durante a anestesia. Todos os outros testes (reflexo cutâneo, reflexo de pinça de cauda, reflexo de endireitamento) e observações (endireitamento, movimentos, excitação) foram menos sensíveis e, portanto, menos úteis como indicadores de anestesia (ARRAS *et al.*, 2001).

Qualquer procedimento cirúrgico só deve ser realizado após a comprovação de que o resposta motora reflexa foi abolida. Caso esteja presente, uma nova dose de anestésico deve ser aplicada e, esperado o tempo de latência, a resposta deve ser testada novamente. Durante o procedimento cirúrgico, o plano anestésico deve ser periodicamente reavaliado, já que a duração de efeito dos fármacos anestésicos pode sofrer variações entre indivíduos.

Em geral, os procedimentos experimentais envolvendo roedores e lagomorfos costumam a ser finalizados com a eutanásia do animal. Porém, ao analisarmos os procedimentos cirúrgico-anestésicos, é conveniente classificá-los em: procedimento sem despertar, no qual a eutanásia ocorre sem que o animal saia do plano de anestesia cirúrgica; e procedimento com despertar, quando o animal retoma consciência, independente do tempo que vai ser mantido em observação antes do momento da eutanásia (horas, dias, meses ou anos).

Em procedimentos sem despertar, a preocupação central é que o animal seja mantido em plano anestésico adequado durante todo o procedimento, já que isso garante que estará inconsciente e, portanto, incapaz de experimentar a experiência de dor. Entretanto, em procedimentos com despertar, além de garantir a manutenção de plano

adequado de anestesia, é fundamental o uso de analgésicos que atuem nos diferentes pontos das vias da dor, garantindo que sejam protegidos, reduzindo a sua ativação pelos estímulos nociceptivos. Esse cuidado deve ser tomado para que, quando o animal recupere a consciência e possa perceber a dor, esta seja mais facilmente controlada. Nesse ponto, é interessante citar o conceito de analgesia preemptiva, que se refere à administração de fármacos antes de expor o paciente ao estímulo nociceptivo, e é considerado um procedimento adequado para prevenir ou minimizar a intensidade da dor pós-operatória (KISSIN; WEISKOPF, 2000).

4 | CONSIDERAÇÕES SOBRE PROTOCOLOS ANESTÉSICOS/ANALGÉSICOS TRANSOPERATÓRIOS

O anestésico injetável mais comumente utilizado em animais de laboratório é a quetamina. Em pequenos roedores, não é aconselhável o uso da via de administração intramuscular devido à massa muscular reduzida, sendo, usualmente, substituída pela via intraperitoneal para evitar dor local. A quetamina pode ser utilizada como sedativo potente, indutor anestésico e fármaco de manutenção em procedimentos curtos. Costuma ser associada a sedativos ou analgésicos. Nas associações, podem ser utilizados um ou mais fármacos analgésicos e/ou sedativos. As doses de cada fármaco devem ser ajustadas de acordo com as combinações, garantindo plano anestésico adequado e segurança do protocolo.

Foram testadas a eficácia e segurança de 8 protocolos anestésicos de associação quetamina associada a diferentes doses de fármacos sedativos e analgésicos (xilazina, medetomidina, azaperone e acepromazina). O protocolo de quetamina, 100 mg/ kg; xilazina, 20 mg/ kg; e acepromazina, 3 mg/ kg foi a mistura que apresentou maior eficácia e ausência de mortalidade. Três outras misturas tiveram menor eficácia e margem de segurança: induziram taxas mais baixas de tolerância cirúrgica (apenas 30 a 50% dos animais apresentaram plano anestésico satisfatório) e taxas de mortalidade mais altas (10 a 40%). Outras quatro não foram capazes de induzir tolerância cirúrgica (ARRAS *et al.*, 2001). No estudo citado não foram testados protocolos incluindo fármacos opioides, como o tramadol ou morfina, que, por seu alto poder analgésico, têm sido utilizados em associação com a quetamina e demonstrado eficácia e segurança.

O uso de anestésicos inalatórios também é bastante recomendável. Dentre eles, os mais utilizados para anestesia de animais em pesquisa são o isoflurano e o sevoflurano. O sevoflurano apresenta tempo e indução e de despertar ligeiramente mais rápido que o isoflurano, mas o mecanismo de ação é basicamente o mesmo.

O uso correto de anestésicos inalatórios se dá através do uso de vaporizador e fonte de ar comprimido e/ou oxigênio. O uso desses fármacos, embebidos em algodão ou gaze, implicam em concentrações de anestésico muito acima do ideal para a manutenção de anestesia, criando a necessidade e oferta intermitente dos fármacos. Assim, a concentração

de anestésico se mantém instável durante o procedimento cirúrgico e o animal apresenta períodos de overdose anestésica (aumenta o risco de óbito no procedimento) e períodos de superficialização de plano (presença de consciência e dor para o animal).

Quando utilizados de forma correta, os anestésicos inalatórios apresentam algumas vantagens quando comparados com os agentes injetáveis: maior controle do plano anestésico (possibilidade de alteração de plano anestésico de forma rápida); rápida indução e rápido retorno da anestesia; menor custo por hora de anestesia depois de diluído o custo inicial para implantação do sistema. Os anestésicos inalatórios não possuem efeito analgésico, além do efeito de perda da consciência, por isso devem ser associados a analgésicos em procedimentos cirúrgicos com despertar.

5 | OUTROS CUIDADOS TRANSOPERATÓRIOS PARA GARANTIA DE BEM-ESTAR

O controle da temperatura corporal é um fator importante a ser controlado durante e após o procedimento anestésico. O uso de anestésico reduz o metabolismo e predispõe a queda da temperatura, e, em caso de cirurgia com a abertura de cavidades, aumenta a perda de calor. Além disso, deve-se considerar que, em animais muito pequenos (ratos, camundongos, cobaias, inclusive coelhos), a perda de calor é muito mais acentuada pela alta relação superfície/volume corporal (CLARK-PRICE *et al*., 2021).

A coloração e o tempo de preenchimento de mucosa, o balanceamento hídrico (fluidoterapia) e o ressecamento da córnea (uso de pomadas ou colírios) também devem ser controlados.

6 | EFEITOS DA DOR NA FISIOLOGIA

A dor não tratada pode dificultar a cicatrização dos tecidos. A cura óssea, por exemplo, é promovida por estimulação mecânica. Assim como foi demonstrado em ratos, o alívio eficaz da dor e o consequente aumento do uso da parte afetada do corpo são importantes para a cura (SCHWARZ *et al*., 2013).

Além dos mecanismos locais, os impulsos dolorosos ascendentes levam à ativação hipotalâmica e aumento da atividade simpático-adrenérgica do sistema. Essa ativação resulta em efeitos cardiovasculares substanciais, tais como mudanças na frequência cardíaca e na sua variabilidade, como foi demonstrado em camundongos (ARRAS *et al*., 2007), além de aumento da contratilidade, que gera aumento do consumo de oxigênio com risco de hipóxia isquêmica de miocárdio e arritmias e maior vasoconstrição periférica, que aumenta o risco de hipóxia em órgãos. No sistema gastrointestinal há vasoconstrição, redução de motilidade e translocação bacteriana. Entre as alterações no sistema respiratório, podem ser citadas: variações no tônus vascular pulmonar; aumentos nas concentrações de dióxido de carbono no ar expirado; diminuição da capacidade residual funcional, o que pode levar

a atelectasias e, por consequência, hipoventilação e hipóxia.

A dor é indutora de estresse e afeta a secreção de muitos hormônios, neurotransmissores e enzimas. Por exemplo, a dor não tratada aumenta a secreção de catecolaminas, como noradrenalina, corticoides, glucagon, hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e hormônio antidiurético (ADH), e diminui a secreção de insulina e testosterona em muitas espécies (CARSTENS; MOBERG, 2000). O aumento do cortisol e hormônio adeno-cortico-esteroide geram imunossupressão, e ambos, em conjunto com as catecolaminas, levam à redução das concentrações plasmáticas de insulina e aumento de glicose. Com a redução de insulina, a glicose não consegue ser captada do sangue para as células e há lipólise e catabolismo muscular proteico (para garantir disponibilidade de energia para o organismo) com resultante caquexia. O aumento do hormônio antidiurético gera retenção urinária, desbalanço hídrico eletrolítico com retenção hídrica e sódica e aumento da excreção de potássio.

Além disso, a dor não tratada pode afetar o sistema imunológico através da redução das células *natural killer* e da reatividade mista de linfócitos (PAGE, 2003).

Em situação de dor não tratada, mudanças típicas no comportamento do roedor incluem redução da ingestão de alimentos e água, mudanças no padrão de atividade, redução do sono, um ritmo circadiano alterado, perda de diversidade comportamental e mudanças nos cuidados sociais, na construção de ninhos e no comportamento de escavação (CARSTENS; MOBERG, 2000; JIRKOF *et al.*, 2010, 2013).

A dor manifestada durante um período prolongado pode provocar hipersensibilidade central, assumindo um caráter crônico e tornando-se mais difícil de ser tratada (DRUMMOND, 2000).

7 | ROTINA DE USO DE ANALGÉSICOS NA PESQUISA BIOMÉDICA

A dor induzida por procedimentos, doenças e lesões é uma causa potencial de sofrimento em animais utilizados na experimentação. No entanto, o controle da dor é mais do que uma questão ética e de bem-estar animal, tendo importantes implicações científicas e metodológicas para a concepção de experimentos e a qualidade dos resultados do estudo (JIRKOF, 2017).

Entre 1990-1992, na avaliação de uma amostra de estudos publicados em periódicos com revisão por pares e que incluíam procedimento cirúrgico, apenas 3% relataram administração de analgésicos (RICHARDSON; FLECKNELL, 2005). Em uma amostra de 172 artigos, entre 2000-2001, analgésicos foram administrados em 10% dos estudos, e entre 2005-2006, em 20% dos estudos (STOKES; FLECKNELL; RICHARDSON, 2009). Resultados sobre anestesia e analgesia em pesquisas realizadas com animais foram avaliados a partir da revisão de 77 publicações consecutivas em três revistas de cuidados intensivos durante o ano de 2012. O monitoramento do nível de anestesia durante os

procedimentos invasivos descritos foi demonstrado em apenas 7% dos estudos. Quando a dor era esperada, alguma medicação analgésica foi utilizada em apenas 14% dos casos, e o monitoramento do nível de dor foi realizado em apenas 4%. Não foi dada justificativa para nenhum dos casos em que a analgesia seria recomendada e não foi utilizada (BARA; JOFFE, 2014).

Apesar do uso de analgésicos em animais de laboratório ter aumentado nos últimos anos, o cenário é ainda de negligência no uso (RICHARDSON; FLECKNELL, 2005). A maioria dos artigos que descrevem procedimentos potencialmente dolorosos em roedores ainda não relatam administração de analgésicos sistêmicos (STOKES; FLECKNELL; RICHARDSON, 2009).

Um dos fatores que contribuem para relutância em administrar analgésicos em protocolos experimentais é o temor dos pesquisadores quanto à possível interferência do efeito dos analgésicos nos resultados experimentais. A escolha do protocolo de analgesia para uma questão de pesquisa específica é desafiadora. O protocolo de analgesia ideal deve aliviar dor de forma confiável e sem efeitos colaterais que possam prejudicar o bem-estar animal. Além disso, deve ter um efeito controlável no sistema específico em foco no experimento. A dor, em muitos casos, não pode ser completamente abolida, mas deveria ser minimizada e controlada. Para escolher um protocolo de analgesia adequado, deve-se identificar o tipo de dor (nociceptiva, neuropática, idiopática ou mista), bem como sua intensidade e duração, e não existe analgesia que sirva para todos (JIRKOF, 2017). Porém, é fundamental que o pesquisador não deixe de considerar os efeitos da própria dor na fisiologia. A dor e o estresse geralmente aumentam a variação do resultado experimental, e, consequentemente, um animal com dor ou estresse é um objeto pobre de pesquisa.

Além disso, a resistência à utilização de analgésicos ocorre também por falta de conhecimento dos benefícios fisiológicos da analgesia, falta de familiarização com os fármacos disponíveis, temor de que a utilização de agentes potentes possa levar os animais a quadros de dependência química, depressão respiratória ou a problemas gastrintestinais e, principalmente, pela dificuldade de se diagnosticar a dor nos animais e desvalorização da dor em animais (HEWSON; DOHOO; LEMKE, 2006).

Qualquer fármaco incluído em uma pesquisa apresentará influência nos resultados, sendo responsabilidade do pesquisador buscar na literatura os fármacos que apresentem mínimos efeitos nos objetivos principais da pesquisa em questão, podendo solicitar auxílio de um veterinário com experiência em analgesia veterinária. Os efeitos esperados pelo uso de fármacos analgésicos a uma determinada dose são muito mais controlados - e afetarão tanto animais do grupo controle quanto animais do grupo experimental (devem ser aplicados em todos os animais) – do que os efeitos fisiológicos causados pela dor e estresse (que afetarão apenas os animais que passarem pelo procedimento, e apresentam variabilidade individual muito maior).

Além disso, sob o ponto de vista ético, é inaceitável realizar um procedimento

cirúrgico ou outro procedimento doloroso com despertar do animal e não realizar analgesia pós-operatória.

8 | AVALIAÇÃO DE GRAVIDADE DE PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

A gravidade de um procedimento deve ser determinada pelo grau de dor, sofrimento, angústia ou dano duradouro que um animal pode sentir durante o procedimento (SMITH *et al.*, 2018).

De acordo com o Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), a gravidade dos protocolos experimentais deve ser classificada de acordo com uma escala de grau de invasividade. O grau de invasividade de um protocolo deve ser igual ao maior grau de invasividade atribuído dentre os procedimentos que compõem o protocolo (BRASIL, 2021). (Quadro 1).

Na Diretiva europeia em vigor (2010/63/EU), a classificação da gravidade é dada pelo grau de severidade estimada que deve ser atribuída a cada um dos procedimentos realizados nos animais utilizados para fins científicos (Quadro 1). Porém, além da classificação de gravidade prospectiva, após a realização dos procedimentos, a gravidade real experimentada por cada animal durante seu curso deve ser avaliada e determinada individualmente, e relatada nas informações estatísticas anuais disponibilizadas publicamente. Essa abordagem oferece uma oportunidade para uma análise do refinamento desde o início até a conclusão de um procedimento, contribuindo para melhorar a qualidade da ciência e do bem-estar animal e proporcionando maior transparência e confiança do público quanto ao uso de animais na pesquisa, já que os dados são divulgados em relatórios públicos. Tais publicações podem fornecer informações para reavaliação contínua do refinamento, estabelecendo padrões mais altos de refinamento para estudos futuros nos casos em que o grau de severidade real foi subestimado (SMITH *et al.*, 2018; THE EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION, 2010).

Ainda na diretiva Europeia, além da classificação de severidade prospectiva, é indicado que seja realizada a análise de dano/benefício para todos os projetos avaliados nos comitês de ética. Para análise de todos os possíveis danos ao bem-estar de todos os animais, são necessárias mais informações sobre cada um dos procedimentos do que as fornecidas por uma simples classificação de severidade (BRØNSTAD *et al.*, 2016; LABER *et al.*, 2016; SMITH *et al.*, 2018).

Para exemplificar, em um estudo de desafio de vacinação, alguns animais (controles não vacinados) podem apresentar doença clínica grave, exigindo uma atribuição de “grave” ao procedimento de infecção experimental e ao estudo, ainda que, em contraste, seria de se esperar que a maioria dos animais que receberam uma vacina eficaz não apresentasse mais do que efeitos adversos leves. Apesar de o estudo ser classificado como “grave”, em se tratando de um projeto que visa contribuir para o desenvolvimento de uma nova vacina

contra uma doença associada a quadro clínico grave e uma alta mortalidade, a análise de dano/benefício poderia ser favorável. Obviamente levando em consideração outros fatores, como experiência dos pesquisadores e implementação dos 3Rs nos procedimentos (BRØNSTAD *et al.*, 2016; LABER *et al.*, 2016; SMITH *et al.*, 2018).

Para determinar a gravidade real, há uma necessidade do desenvolvimento de sistemas de registro e avaliação, adaptados para cada projeto, que irão capturar todas as informações necessárias e facilitar a avaliação subsequente e categorização da gravidade real, além de serem ferramentas úteis para a avaliação de bem-estar e critérios de ponto final.

Grau de invasividade (RN 52//2021)	Grau de severidade (2010/63/EU)
Grau de invasividade I: Experimentos que causam pouco ou nenhum desconforto ou estresse (ex.: observação e exame físico; administração oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, ou intramuscular de substâncias que não causem reações adversas perceptíveis; eutanásia por métodos aprovados após anestesia ou sedação; deprivação alimentar ou hídrica por períodos equivalentes à deprivação na natureza).	**Sem recuperação:** Os procedimentos realizados inteiramente sob anestesia geral, da qual o animal não recupere a consciência.
Grau de invasividade II: Experimentos que causam estresse, desconforto ou dor, de leve intensidade (ex.: procedimentos cirúrgicos menores, como biópsias, sob anestesia; períodos breves de contenção e imobilidade em animais conscientes; exposição a níveis não letais de compostos químicos que não causem reações adversas graves).	**Leve:** Os procedimentos com resultados nos quais é provável que os animais sintam dor, sofrimento ou angústia ligeiros a curto prazo, bem como os procedimentos sem prejuízo significativo do bem-estar ou do estado geral dos animais.
Grau de invasividade III: Experimentos que causam estresse, desconforto ou dor, de intensidade intermediária (ex.: procedimentos cirúrgicos invasivos conduzidos em animais anestesiados; imobilidade física por várias horas; indução de estresse por separação materna ou exposição a agressor; exposição a estímulos aversivos inescapáveis; exposição a choques localizados de intensidade leve; exposição a níveis de radiação e compostos químicos que provoquem prejuízo duradouro da função sensorial e motora; administração de agentes químicos por vias como a intracardíaca e intracerebral).	**Moderado:** Procedimentos em animais com resultados nos quais eles podem sentir dor, sofrimento ou angústia moderada de curto prazo, ou dor leve de longa duração, sofrimento ou angústia, bem como procedimentos que podem causar comprometimento moderado do bem-estar ou estado geral dos animais.
Grau de invasividade IV: Experimentos que causam dor de alta intensidade (ex.: indução de trauma a animais não sedados).	**Severo:** Procedimentos com resultados nos quais os animais são susceptíveis de sentir dor severa, sofrimento ou angústia, ou dor moderada de longa duração, sofrimento ou angústia, bem como procedimentos que são susceptíveis de causar graves prejuízos ao bem-estar ou condição geral dos animais.

QUADRO 1: Classificação de gravidade de protocolos/procedimentos experimentais

Fonte: Mariana Abreu, 2023.

9 | CRITÉRIOS PARA RECONHECIMENTO DE BEM-ESTAR E DOR PÓS-PROCEDIMENTO

Reconhecer e classificar a severidade da dor inicia-se com a observação do animal. Esse procedimento é subjetivo e, por isso, complicado em diversos aspectos. Primeiro, porque os animais não podem expressar a dor verbalmente. Segundo, porque o comportamento observado pode não refletir a intensidade da dor, e o grau de domesticação e socialização do animal poderá influenciar sua percepção (quando se torna vantajoso, ou não, exprimir seu comportamento de forma clara). Terceiro, porque o comportamento varia entre os diferentes indivíduos. Quarto, porque os observadores, clínicos e pesquisadores com pensamentos e experiências diferentes, podem ter múltiplas interpretações de uma mesma observação (CONZEMIUS *et al.*, 1997).

Considerando as dificuldades na avaliação da dor, a intensidade do trauma deve ser estimada antes do procedimento (através da classificação de gravidade estimada do procedimento). Essa classificação deve ser um ponto de partida para estimar a dor pós-operatória e definir o tratamento analgésico inicial. Em geral, quanto mais invasivo o procedimento, mais extensa a lesão tecidual e maior a gravidade estimada. Podemos, então, estimar a dor pós-procedimento em leve, moderada ou severa. Considerando que os animais possuem um sistema nervoso semelhante ao dos seres humano, consideramos a intensidade da dor para um determinado procedimento em humanos como um guia para a classificação da gravidade do procedimento para os animais (princípio da analogia). A partir da classificação inicial, deve ser estabelecido um protocolo analgésico e constantes reavaliações devem ser realizadas para verificar se o tratamento instituído está adequado ou se deve ser realizado resgate analgésico ou aplicação de critério de ponto final. A intensidade de dor frente a um estímulo é uma resposta individual (HELLYER; GAYNOR, 1998). (Figura 2).



Figura 2. Esquema básico de etapas de tratamento da dor pós-operatória

Fonte: Mariana Abreu, 2023.

Assim sendo, apesar das diversas limitações teóricas e práticas, a observação e a interpretação criteriosa do comportamento e dos sinais fisiológicos constituem, essencialmente, o único meio clínico para avaliar a resposta do animal a uma injúria ou uma doença. É importante ressaltar que doença ou injúria são rotineiramente acompanhadas por outros fatores de estresse, que também afetam o comportamento (HANSEN, 1997).

Sinais fisiológicos indiretos de dor moderada incluem identificação de elevação nos valores de alguns parâmetros, como frequência cardíaca, frequência respiratória e pressão arterial e verificação de determinadas alterações fisiológicas, tais como: dilatação da pupila, aumento da temperatura corporal, salivação, identificação de complexos ventriculares prematuros (HELLYER; GAYNOR, 1998; MORTON; GRIFFITHS, 1985).

Os sinais comportamentais gerais relacionados à presença de dor incluem em camundongos: redução do comportamento de autolimpeza, nível reduzido de atividade espontânea, piloereção, postura curvada, olhos semicerrados, aumento da agressividade quando manuseados, distanciamento de outros animais da gaiola, redução da ingestão de alimentos / água. E em ratos: redução do comportamento de autolimpeza, nível reduzido de atividade espontânea, piloereção, secreções de porfirina (oculares / nasais), olhos vesgos e semicerrados, redução da ingestão de alimentos e água, aumento da agressividade quando manuseados (ACLAM TASK FORCE MEMBERS *et al.*, 2007), aumento do arqueamento das costas, alongamento horizontal, contorções abdominais, queda / cambaleando, marcha deficiente e espasmos (ROUGHAN; FLECKNELL, 2001, 2003). Em coelhos, podem ser citados: atividade reduzida, redução do comportamento de autolimpeza, redução da ingestão de alimentos e / ou água, olhos vesgos, postura alterada, contração do abdômen, tensionamento de músculos, postura de defesa, tentativa de se esconder ou agressividade,

ranger de dentes (ACLAM TASK FORCE MEMBERS *et al.*, 2007).

Dentre as formas de avaliar a dor, as escalas de expressão facial constituem ferramentas úteis para avaliar dor e analgesia em populações que não apresentam possibilidade de comunicação verbal (bebês, crianças, pessoas com déficit cognitivo) (LANGFORD *et al.*, 2010). Apesar de evidências prévias de que mamíferos, inclusive roedores, são capazes de utilizar expressão facial para demonstrar estados emocionais (GRILL; NORGREN, 1978), esse parâmetro ainda não tinha sido utilizado para a avaliação da dor. Em 2010, o departamento de fisiologia da Universidade McGill, Montreal, publicou uma escala de avaliação de dor por expressão facial para camundongos (LANGFORD *et al.*, 2010) e, no ano seguinte, outra para ratos (SOTOCINAL *et al.*, 2011). São as únicas duas escalas para avaliação de dor em roedores que passaram por um processo de validação, e, depois das publicações iniciais, houve diversas outras nas quais as escalas foram utilizadas para avaliar dor associada a diferentes modelos experimentais. Os parâmetros avaliados por essas escalas são: (1) Contração orbital - estreitamento da área orbital, com pálpebra bem fechada ou olho apertado (denotado por rugas ao redor dos olhos); (2) achatamento do nariz e bochecha - animais com dor podem exibir sucessivamente menos abaulamento do nariz e bochecha, com eventual ausência do vinco entre a bochecha e área dos bigodes; (3) alterações da posição das orelhas - as orelhas de animais com dor tendem a dobrar, curvar e inclinar para frente ou para fora, resultando em uma forma pontiaguda. O espaço entre as orelhas pode aparecer maior; (4) posição de bigodes - animais com dor apresentam deslocamento da posição normal dos bigodes; para trás, contra a face, ou para a frente ("em pé"). Os bigodes podem também podem estar aglutinados (LANGFORD *et al.*, 2010; SOTOCINAL *et al.*, 2011).

Também foi publicada uma escala de dor por expressão facial para lagomorfos (KEATING *et al.*, 2012) e, recentemente, foi validada uma escala composta para avaliação de dor em lagomorfos (BANCHI *et al.*, 2020).

As escalas de expressão facial para ratos e camundongos apresentaram alto nível de evidências de suas propriedades de medição, e a escala de expressão facial para coelhos apresentou processo de validação parcial e moderado nível de evidências de suas propriedades de medição (EVANGELISTA; MONTEIRO; STEAGALL, 2021).

Os autores indicam o grau de alteração de cada um dos parâmetros de expressão facial em caso de dor leve, moderada e severa. Na prática, consideramos que o uso da escala de expressão facial de forma isolada é útil para avaliar dor severa, apenas. Nos casos de dor leve ou moderada, consideramos necessária a associação da avaliação da escala facial com outros parâmetros fisiológicos e comportamentais citados anteriormente, criando escores de avaliação de dor incluindo os diferentes parâmetros, e que podem ser construídos com detalhes específicos das alterações esperadas de acordo com o a região do corpo do animal em que procedimento foi realizado.

O uso de escalas de escore de avaliação de dor é uma forma de converter

observações subjetivas de dor em um sistema de pontuação objetivo. Para cada critério escolhido pelos pesquisadores como indicativo de percepção da dor, é dado um valor ponderado (geralmente variando de 1 a 5) e somado para criar uma pontuação geral de dor para a intervenção. As pontuações totais mais altas são indicativas de maior estado de dor. Devem ser definidos os pontos de corte da pontuação que indiquem necessidade de intervenções, tais como resgate analgésico ou desfechos humanitários (exclusão do animal do estudo, podendo também ser indicada a eutanásia precoce) (ACLAM TASK FORCE MEMBERS *et al*., 2007). As normas para decisões sobre aplicação de resgate analgésico e desfechos humanitários nos animais submetidos a procedimentos de pesquisa devem ser estabelecidas no momento de submissão do projeto ao Comitê de Ética para uso de Animais. Ou seja, antes de iniciado protocolo experimental, e, inclusive, antes dos estudos piloto (BRASIL, 2018).

10 | VIAS DE ADMINISTRAÇÃO E PROTOCOLOS ANALGÉSICOS PARA CONTROLE DA DOR PÓS-PROCEDIMENTOS

Considerando a redução de estresse de manuseio, menor necessidade de habilidade técnica e menor tempo dispendido pelo pesquisador, a administração de analgésicos para roedores em água ou alimentos poderia ter um apelo em comparação com a aplicação de injeções. Entretanto, esse tipo de administração não apresenta garantia de que a dose adequada é efetivamente administrada para cada animal (SPETH; SMITH; BROGAN, 2001). A buprenorfina preparada em formato de gelatina com sabor tem sido recomendada e amplamente utilizada (FLECKNELL; ROUGHAN; STEWART, 1999), entretanto, o consumo da gelatina deve ser, obrigatoriamente, monitorado e há dados que apontam dúvidas sobre o poder analgésico ser efetivamente alcançado (MARTIN *et al*., 2001). Simplesmente contar com ingestão suficiente de alimentos ou água no pós-operatório para atingir níveis sanguíneos de analgésicos eficazes é problemático.

Até que a extensão e reprodutibilidade da analgesia fornecida por compostos ofertados por meio de alimentos ou água potável sejam confirmadas, é mais prudente confiar apenas na administração de analgésicos com eficácia comprovada para alívio da dor por via parenteral ou por gavagem (ACLAM TASK FORCE MEMBERS *et al*., 2007).

Os fármacos analgésicos em geral têm uma ação relativamente curta, o que pode limitar o tratamento, considerando as horas em que há pessoal trabalhando nos biotérios. A recomendação geral obrigatória é que é fundamental garantir que os fármacos analgésicos ou associações escolhidas mantenham seu efeito analgésico por todo o intervalo entre as aplicações. Por isso, devem ser priorizados fármacos com tempo de ação maior ou fármacos de liberação contínua com o implante de bombas osmóticas subcutâneas.

A seleção do analgésico apropriado depende de tempo entre a aplicação e início do efeito, magnitude de seu efeito e duração. A intensidade e a duração da dor após a cirurgia dependem não apenas do procedimento específico, mas, também, da habilidade

do operador, do protocolo anestésico, detalhes do período perioperatório e do manejo dos animais. Idade, sexo e antecedentes genéticos também desempenham um papel importante. A última variável é particularmente problemática para camundongos geneticamente modificados com diferentes fundos genéticos. Consequentemente, a seleção de uma dosagem específica em uma cepa pode levar à sobredosagem ou analgesia ineficaz em algumas cepas (ACLAM TASK FORCE MEMBERS *et al*., 2007).

Portanto, o tratamento eficaz da dor em camundongos, ratos e lagomorfos depende da avaliação clínica e ajuste de fármacos e doses para atender as necessidades analgésicas do animal ou específicas da cepa. Um estudo piloto é uma forma interessante de determinar o protocolo analgésico adequado para um estudo específico ou grupos de estudos semelhantes realizados de um determinado laboratório, considerando o modelo animal e o desenho experimental (ACLAM TASK FORCE MEMBERS *et al*., 2007). Também deve ser considerado o objetivo do estudo, buscando um protocolo analgésico que interfira o mínimo possível nos resultados experimentais.

REFERÊNCIAS

ACLAM TASK FORCE MEMBERS et al. Public statement: guidelines for the assessment and management of pain in rodents and rabbits. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science:** JAALAS, v. 46, n. 2, p. 97–108, mar. 2007.

ARRAS, M. *et al*. Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. **Comparative Medicine**, v. 51, n. 5, p. 443–456, out. 2001.

ARRAS, M. *et al*. Assessment of post-laparotomy pain in laboratory mice by telemetric recording of heart rate and heart rate variability. **BMC veterinary research**, v. 3, p. 16, 2 ago. 2007.

BANCHI, P. *et al.* Reliability and construct validity of a composite pain scale for rabbit (CANCRS) in a clinical environment. **PLOS ONE**, v. 15, n. 4, p. e0221377, 30 abr. 2020.

BARA, M.; JOFFE, A. R. The ethical dimension in published animal research in critical care: the public face of science. **Critical Care (London, England)**, v. 18, n. 1, p. R15, 14 jan. 2014.

BOURNE, S.; MACHADO, A. G.; NAGEL, S. J. Basic anatomy and physiology of pain pathways. **Neurosurgery Clinics of North America**, v. 25, n. 4, p. 629–638, out. 2014.

BRASIL. Resolução Normativa nº 32. **Baixa as Diretrizes de Integridade e de Boas Práticas para Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica**. 6 set. 2016.

BRASIL. Resolução Normativa nº 37. **Anexo da diretriz da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal**. 15 fev. 2018.

BRØNSTAD, A. *et al.* Current concepts of Harm–Benefit Analysis of Animal Experiments – Report from the AALAS–FELASA Working Group on Harm–Benefit Analysis – Part 1. **Laboratory Animals**, v. 50, n. 1_suppl, p. 1–20, jun. 2016.

BULGER, R. E. Use of animals in experimental research: a scientist's perspective. **The Anatomical Record**, v. 219, n. 3, p. 215–220, nov. 1987.

CARSTENS, E.; MOBERG, G. P. Recognizing Pain and Distress in Laboratory Animals. **ILAR Journal**, v. 41, n. 2, p. 62–71, 1 jan. 2000.

CLARK-PRICE, S. C. *et al*. Multicenter study to investigate factors associated with change in rectal temperature during anesthesia in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 258, n. 1, p. 64–71, 1 jan. 2021.

CONZEMIUS, M. G. *et al*. Correlation between subjective and objective measures used to determine severity of postoperative pain in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 210, n. 11, p. 1619–1622, 1 jun. 1997.

DRUMMOND, J. P. Dor pós-operatória. *In*: **Dor aguda:** Fisiopatologia, clínica e terapêutica. [s.l.] Atheneu, 2000. p. 27–55.

EVANGELISTA, M. C.; MONTEIRO, B. P.; STEAGALL, P. V. Measurement properties of grimace scales for pain assessment in non-human mammals: a systematic review. **Pain**, 9 set. 2021.

FLECKNELL, P. A.; ROUGHAN, J. V.; STEWART, R. Use of oral buprenorphine ('buprenorphine jello') for postoperative analgesia in rats-a clinical trial. **Laboratory Animals**, v. 33, n. 2, p. 169–174, 1 abr. 1999.

GRILL, H. J.; NORGREN, R. The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. **Brain Research**, v. 143, n. 2, p. 263–279, mar. 1978.

GUILLÉN, J.; VERGARA, P. Chapter 1 - Global Guiding Principles: A Tool for Harmonization. *In*: **Laboratory Animals**: Regulations and Recommendations for the Care and Use of Animals in Research Book. 2. ed. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 1–13.

HALL, J. E.; GUYTON, A. C. **Guyton and Hall textbook of medical physiology**. 12. ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2011.

HANSEN, B. Through a glass darkly: Using behavior to assess pain. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery**: Small Animal, v. 12, n. 2, p. 61–74, maio 1997.

HELANDER, E. M. *et al*. Multimodal Analgesia, Current Concepts, and Acute Pain Considerations. **Current Pain and Headache Reports**, v. 21, n. 1, p. 3, jan. 2017.

HELLYER, P. W.; GAYNOR, J. S. Acute postsurgical pain in dogs and cats. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 20, n. 2, p. 140–154, 1998.

HEWSON, C. J.; DOHOO, I. R.; LEMKE, K. A. Factors affecting the use of postincisional analgesics in dogs and cats by Canadian veterinarians in 2001. **The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne**, v. 47, n. 5, p. 453–459, maio 2006.

JAKUSCHEIT, A. *et al*. Utility of nociceptive flexion reflex threshold and bispectral index to predict movement responses under propofol anaesthesia. **Somatosensory & Motor Research**, v. 34, n. 2, p. 139–144, 3 abr. 2017.

JIRKOF, P. *et al*. Burrowing Behavior as an Indicator of Post-Laparotomy Pain in Mice. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 4, 2010.

JIRKOF, P. *et al*. Assessment of postsurgical distress and pain in laboratory mice by nest complexity scoring. **Laboratory Animals**, v. 47, n. 3, p. 153–161, jul. 2013.

JIRKOF, P. Side effects of pain and analgesia in animal experimentation. **Lab Animal**, v. 46, n. 4, p. 123–128, abr. 2017.

KEATING, S. C. J. *et al*. Evaluation of EMLA Cream for Preventing Pain during Tattooing of Rabbits: Changes in Physiological, Behavioural and Facial Expression Responses. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e44437, 7 set. 2012.

KISSIN, I.; WEISKOPF, R. B. Preemptive Analgesia. **Anesthesiology**, v. 93, n. 4, p. 1138–1143, 1 out. 2000.

KITCHEN, H. *et al.* Panel Report on the Colloquium on Recognition and Alleviation of Animal Pain and distress. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 191, n. 10, p. 1186–1192, 1987.

LABER, K. *et al.* Recommendations for Addressing Harm–Benefit Analysis and Implementation in Ethical Evaluation – Report from the AALAS–FELASA Working Group on Harm–Benefit Analysis – Part 2. **Laboratory Animals**, v. 50, n. 1_suppl, p. 21–42, jun. 2016.

LAMONT, L. A.; TRANQUILLI, W. J.; GRIMM, K. A. Physiology of Pain. **Veterinary Clinics of North America:** Small Animal Practice, v. 30, n. 4, p. 703–728, jul. 2000.

LANGFORD, D. J. *et al*. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. **Nature Methods**, v. 7, n. 6, p. 447–449, jun. 2010.

MARTIN, L. B. *et al*. Analgesic efficacy of orally administered buprenorphine in rats. **Comparative Medicine**, v. 51, n. 1, p. 43–48, fev. 2001.

MORTON, D.; GRIFFITHS, P. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. **Veterinary Record**, v. 116, n. 16, p. 431–436, 20 abr. 1985.

PAGE, G. G. The immune-suppressive effects of pain. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 521, p. 117–125, 2003.

RICHARDSON, C. A.; FLECKNELL, P. A. Anaesthesia and Post-operative Analgesia following Experimental Surgery in Laboratory Rodents: Are we Making Progress? **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 33, n. 2, p. 119–127, abr. 2005.

ROUGHAN, J. V.; FLECKNELL, P. A. Behavioural effects of laparotomy and analgesic effects of ketoprofen and carprofen in rats. **Pain**, v. 90, n. 1, p. 65–74, fev. 2001.

ROUGHAN, J. V.; FLECKNELL, P. A. Evaluation of a short duration behaviour-based post-operative pain scoring system in rats. **European Journal of Pain**, v. 7, n. 5, p. 397–406, out. 2003.

RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The Principles of Humane Experimental Technique**. London: Methuen, 1959.

SCHWARZ, C. *et al*. Mechanical Load Modulates the Stimulatory Effect of BMP2 in a Rat Nonunion Model. **Tissue Engineering Part A**, v. 19, n. 1–2, p. 247–254, jan. 2013.

SMITH, D. *et al.* Classification and reporting of severity experienced by animals used in scientific procedures: FELASA/ECLAM/ESLAV Working Group report. **Laboratory Animals**, v. 52, n. 1_suppl, p. 5–57, fev. 2018.

SOTOCINAL, S. G. et al. The Rat Grimace Scale: A Partially Automated Method for Quantifying Pain in the Laboratory Rat via Facial Expressions. **Molecular Pain**, v. 7, p. 1744-8069-7–55, 1 jan. 2011.

SPETH, R. C.; SMITH, M. S.; BROGAN, R. S. Regarding the inadvisability of administering postoperative analgesics in the drinking water of rats (Rattus norvegicus). **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science**, v. 40, n. 6, p. 15–17, nov. 2001.

STOKES, E. L.; FLECKNELL, P. A.; RICHARDSON, C. A. Reported analgesic and anaesthetic administration to rodents undergoing experimental surgical procedures. **Laboratory Animals**, v. 43, n. 2, p. 149–154, abr. 2009.

THE EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. **Off J Eur Union 2010**, v. L 276, p. 33–79, 2010.

VON DINCKLAGE, F. *et al*. Comparison of the nociceptive flexion reflex threshold and the bispectral index as monitors of movement responses to noxious stimuli under propofol mono-anaesthesia. **British Journal of Anaesthesia**, v. 102, n. 2, p. 244–250, fev. 2009.

CAPÍTULO 6

ESTUDOS EM INFECÇÕES EXPERIMENTAIS: DOENÇAS PARASITÁRIAS E FÚNGICAS

Data de aceite: 03/07/2023

Monique Ribeiro de Lima
Centro de Experimentação Animal, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz,
Rio de Janeiro/RJ
ORCID 0009-0008-8745-9522

Isabele Barbieri dos Santos
Centro de Experimentação Animal, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz,
Rio de Janeiro/RJ
ORCID 0009-0002-6362-6329

1 | INTRODUÇÃO

O interesse na prevenção e no tratamento de doenças infecciosas existe há milhares de anos. No entanto, foi apenas em meados do século XIX que os cientistas identificaram os microrganismos como o agente causador. À medida que aumentava a nossa compreensão frente à resposta do hospedeiro durante a infecção, foi se desenvolvendo a nossa capacidade de elaborar vacinas e terapias.

Desde o trabalho de pioneiros como Jenner e Pasteur, há mais de um século, os modelos animais forneceram informações essenciais no estudo de doenças infecciosas, sendo necessários para a compreensão do processo inflamatório; das doenças infecciosas específicas e seus tratamentos farmacológicos; no desenvolvimento de vacinas e testes de eficácia e segurança; e para fins de diagnóstico, em medicina humana e veterinária (OLFERT; GODSON, 2000).

Para Colby e colaboradores (2017), o projeto experimental para pesquisa de doenças infecciosas empregando modelos animais requer algumas considerações, entre elas: o entendimento das características inerentes ao modelo animal e ao organismo infeccioso de interesse; a definição objetiva e clara da pesquisa; a compreensão da resposta do animal frente à infecção; a semelhança da doença no sistema modelo em comparação com a condição humana e a disponibilidade de reagentes. Todos esses fatores devem ser considerados juntamente com a ética e o bem-estar animal, incluindo uso de pontos finais humanitários.

Os animais usados na pesquisa de doenças infecciosas podem sentir dor e/ou desconforto resultante do processo da doença, e antever precocemente os sinais pode resultar em reduções significativas no potencial de dor experimentado por esses animais. Os pontos finais humanitários devem ser baseados em valores de variáveis cientificamente válidas, fornecendo informações objetivas sobre o curso da doença (e do possível resultado) no qual um desfecho possa ser antecipado de forma assertiva.

Os padrões éticos geralmente exigem o término de experimentos com animais antes do sofrimento óbvio, o que impossibilita que os estudos de sobrevivência usem a morte real como uma leitura válida. Em particular, a definição de pontos finais humanitários (*endpoints)* objetivos e robustos para a pesquisa de doenças infecciosas tem se mostrado difícil. A objetividade na aplicação de parâmetros humanitários reduz o viés do usuário e, assim, melhora os projetos de estudo em ensaios terapêuticos pré-clínicos, confiabilidade nos resultados e padronização entre laboratórios. Em última análise, a implementação de parâmetros humanitários objetivos e apropriados reduz o número de animais necessários para testar um determinado fenômeno.

A preocupação pública com questões como o bem-estar animal e a validade científica está aumentando, resultando em crescentes demandas regulatórias para a pesquisa com animais, e cumprir os padrões de bem-estar animal, embora tendo os objetivos científicos como de grande importância, muitas vezes é um desafio. Para isso, os pontos finais humanitários dos estudos envolvendo doenças crônicas e progressivas precisam ser estabelecidos considerando quão precocemente no processo da doença os objetivos científicos podem ser alcançados sem causar dor e desconforto aos animais, ou ao menos minimizá-los, caso inevitáveis.

2 | MODELOS ANIMAIS PARA DOENÇAS INFECCIOSAS

Os primeiros passos no desenvolvimento de um modelo animal de doença infecciosa são esclarecer os objetivos específicos do estudo e, em seguida, definir as questões de pesquisa. Esses objetivos devem ser claramente articulados para que o modelo animal escolhido possa ser desenvolvido com a compreensão de seus benefícios e limitações.

Muitos dos patógenos que causam doenças infecciosas humanas não infectam roedores ou outras espécies de mamíferos. O desenvolvimento de modelos animais que permitam o estudo da patogênese desses agentes e avaliação da eficácia de medicamentos é fundamental para identificar as formas de prevenção e tratamento de doenças infecciosas humanas. Os modelos animais podem ser usados de várias maneiras para estudar a patogênese da doença, interações hospedeiro-patógeno e mecanismos de proteção ou tratamento da doença, e esses modelos podem ser naturais ou substitutos.

Os modelos naturais de doenças fazem uso de um patógeno específico e seu hospedeiro natural e têm a vantagem de modelar a interação entre hospedeiro e patógeno,

dentro do contexto biológico apropriado. Isso é importante, pois permite a análise de fatores de virulência e seu papel na invasão, penetração e toxicidade, bem como a resposta imune do hospedeiro ao patógeno. Já os modelos substitutos referem-se ao uso de espécies que só podem ser infectadas com o patógeno de interesse em condições experimentais e estes forneceram uma ferramenta útil para estudar aspectos específicos da patogênese da doença ou da resposta imune do hospedeiro. Avanços recentes na criação de camundongos *knockout* de genes constitutivos ou condicionais abriram as portas para a compreensão do papel de genes hospedeiros específicos no reconhecimento de patógenos, na indução de imunidade inata e/ou adquirida, bem como interações celulares do sistema imunológico (GERDTS *et al*., 2007).

A identificação do tropismo do órgão ou tecido e a análise da fisiopatologia dos órgãos-alvo são fundamentais para o estabelecimento do modelo animal, pois fornecem informações sobre o mecanismo molecular da infecção, a resposta do hospedeiro à infecção e o papel ou função da intervenção proposta. Além disso, durante a consideração da proposta de pesquisa baseada em animais, uma análise de dano-benefício deve ser realizada para avaliar se os danos previstos para os animais são justificados pelos benefícios potenciais da pesquisa. Nesse contexto, "dano" a um animal inclui não apenas agravo físico direto (por exemplo, desconforto e dor), mas também outras deficiências no bem-estar animal. Tanto os danos discretos quanto os danos cumulativos experimentados pelos animais ao longo de todo o experimento devem ser considerados. Já os benefícios potenciais da análise de dano-benefício incluem resultados experimentais que promovam diretamente a melhoria na saúde ou o bem-estar dos seres humanos (por exemplo, o desenvolvimento de novos tratamentos de doenças), bem como avanços mais amplos ou indiretos, incluindo a expansão do conhecimento científico e melhoria da saúde dos animais ou do ecossistema (BRØNSTAD *et al*., 2016).

Assim como é necessário selecionar o animal mais apropriado para a pesquisa de doenças infecciosas, a seleção de um organismo infeccioso com composição genética adequada também é crucial. Além do gênero e da espécie, os pesquisadores também devem considerar a cepa do agente, pois esta pode diferir marcadamente em sua patogênese devido a muitos fatores, incluindo o animal do qual foi originalmente isolada, bem como os ambientes de cultura e crescimento em que foram mantidas (FUX *et al*., 2005).

3 | RESPOSTAS FISIOLÓGICAS ÀS INFECÇÕES

Nas pesquisas em doenças infecciosas, devem ser consideradas as respostas fisiológicas do modelo animal à infecção e a semelhança da progressão da doença em comparação com a espécie hospedeira (por exemplo, humanos). A morbidade e mortalidade são tipicamente os primeiros critérios avaliados, principalmente no contexto de doenças de alta infectividade. Avaliar a morbidade requer a identificação das alterações clínicas e o

momento de seu início durante a progressão da doença.

Os parâmetros como as mudanças na temperatura ou no peso corporal geralmente são indicadores úteis de doença animal, pois são medidas facilmente obtidas. As observações de sinais clínicos, como mudanças no apetite ou nível de atividade após a infecção, também podem ser apropriadas, mas são subjetivas e requerem um conhecimento prático completo da fisiologia e comportamento animal (COLBY *et al*., 2017).

Muitos autores indicam a mensuração da temperatura como importante para o estabelecimento da gravidade da doença, do estado moribundo e da morte iminente em uma variedade de modelos de doenças infecciosas. No entanto, a aplicação e a interpretação dessa medida podem ser complexas, pois a temperatura corporal dos camundongos é influenciada por vários fatores, incluindo a hora do dia, a temperatura ambiente, o tipo de cama e o número de companheiros de gaiola (TOTH, 2000; ADAMSON *et al*., 2013). Portanto, para interpretar com precisão as medidas de temperatura corporal em relação aos critérios de finalização humanitária e minimizar conclusões experimentais errôneas, cada uma dessas variáveis potenciais deve ser mantida constante para um determinado experimento.

As alterações na temperatura corporal são uma ocorrência comum em estudos de doenças infecciosas e podem ser usadas como fatores preditivos para a finalização humanitária, comparadas ao óbito do animal ou sua condição moribunda. A resposta inicial da temperatura corporal à infecção é febre ou hipertermia, no entanto, particularmente em modelos murinos de doenças infecciosas, a febre pode ser transitória.

A diminuição da temperatura corporal, ou hipotermia, no entanto, pode ser um indicador importante de um agravo na condição de saúde do animal, principalmente em doenças específicas ou estados tóxicos. Animais em estado séptico perdem a capacidade de manter a temperatura corporal e uma diminuição da temperatura corporal abaixo de 34,5ºC foi correlacionada com o óbito dos animais em vários modelos de doenças infecciosas (HANKENSON *et al*., 2013). Além disso, dados de camundongos avaliados individualmente mostraram que tanto a frequência cardíaca quanto a temperatura corporal foram relativamente estáveis durante a maior parte da vida do animal, mas caíram vertiginosamente durante as 3 semanas que precederam sua morte (TANKERSLEY *et al*., 2003).

Gavin e Satchell (2017) relataram que a finalização humanitária baseada em hipotermia pode ser aplicada em estudos de DL50, sem a preocupação de reduzir a validade do experimento, e, com isso, reduzindo a dor e o desconforto dos animais precocemente, consistindo em um preditor valioso de sobrevida em estudos de toxicidade.

O uso da termometria retal para monitorar a temperatura central dos animais pode ser empregado, porém esse método pode resultar em um aumento do nível de estresse devido ao manuseio do animal (WARN *et al*., 2003). Outros métodos de aferição de temperatura podem ser realizados por meio de termômetro infravermelho (afere a temperatura de

superfície) ou um método mais moderno de implantação de um chip no subcutâneo (entre as escápulas), que permite a aferição remota da temperatura (HANKENSON *et al*., 2013).

Além da temperatura, o peso corporal também é usado para determinar o ponto final humanitário como fator isolado, bem como associado a outros parâmetros, como sinais clínicos de dor e temperatura corporal. Embora uma perda de peso de mais de 20% em comparação com o peso inicial seja amplamente considerada como um ponto de finalização humanitária comum, alguns autores utilizaram uma perda de peso superior a 15% (TAKAYAMA-ITO *et al*., 2017) ou uma perda de peso absoluta superior a 0,05g por dia como indicador de maior risco de óbito (HANKENSON *et al*., 2013). O desafio de usar apenas as alterações do peso corporal como critério único é que a perda substancial de peso nem sempre leva o animal ao óbito e que, a depender do tipo de infecção experimental, os animais podem vir a óbito sem qualquer alteração no peso. As quantidades totais de peso perdido, bem como sua duração e consistência, devem ser usadas para determinar o ponto final humanitário para modelos animais de doenças infecciosas. Animais em decúbito ou que perderam a capacidade de alcançar comida e água perderão peso rapidamente, e essa observação deve influenciar o ponto final humanitário escolhido.

Outros indicadores são comumente usados em combinação para os pontos finais humanitários, mas alguns envolvem julgamentos subjetivos, e o uso de vários indicadores requer uma cuidadosa consideração. Uma abordagem através de “folha de pontuação”, observando se os indicadores estão presentes ou ausentes ou atribuindo pontuações numéricas a eles, pode fornecer um complemento útil para os observadores, ajudando a melhorar a objetividade da metodologia.

Para levar em consideração os parâmetros exclusivos de cada modelo, recomenda-se a realização de um estudo piloto com uma pequena coorte de animais para determinar efetivamente os fatores preditivos para um modelo ou condição específica quando um modelo semelhante ou experiência anterior não estiver disponível.

4 | RESPOSTAS DE FASE AGUDA

A aplicação dos pontos finais humanitários é um componente-chave para refinar os estudos para cumprir os princípios 3R’s. Em modelos de doença aguda, a morte pode ocorrer em poucas horas após uma intervenção experimental, o que requer acompanhamento intensivo para a determinação do ponto final humanitário.

Os aumentos nos níveis séricos de citocinas e proteínas de fase aguda ocorrem precocemente, antes mesmo de alterações comportamentais e sinais observáveis. Essas alterações bioquímicas podem servir como indicadores da presença de doenças infecciosas e como preditores tanto da gravidade quanto do resultado da doença infecciosa. À medida que o estado da doença infecciosa progride, há alterações fisiológicas e comportamentais que podem desencadear o aparecimento da dor e do distresse no animal. Essas alterações

podem ser avaliadas por meio de observações/listas de verificação para o estabelecimento dos pontos preditivos do resultado experimental e de morte iminente. O experimento pode, então, ser encerrado quando a alteração de comportamento e da fisiologia excedem um ponto predefinido (o ponto final).

As proteínas de fase aguda são bem reconhecidas por sua aplicação na medicina diagnóstica humana e foram descritas como tendo valor no diagnóstico e prognóstico de doenças cardiovasculares, autoimunidade, transplante de órgãos e tratamento de câncer (DEANS, WIGMORE, 2005; RIDKER, 2007). A proteína C-reativa (PCR) foi a primeira proteína de fase aguda descrita (no início da década de 1930), e sua presença no início da infecção pneumocócica de macacos e humanos levou à criação do termo "fase aguda". Hoje, a PCR continua sendo uma proteína de fase aguda de interesse primário em humanos, como um importante marcador de infecção, doença autoimune, trauma, malignidade e necrose, incluindo infarto do miocárdio. Além disso, a PCR foi proposta como um marcador para avaliações de bem-estar, que é um papel comum proposto em muitos estudos de proteína de fase aguda em humanos e animais (KAO, SHIESH, WU, 2006),

Um efeito das citocinas em animais é a produção de inapetência ou anorexia. Assim, a perda de peso resultante é um indicador cardinal da gravidade da doença infecciosa em modelos animais. O peso corporal pode ser monitorado por vários sistemas de pontuação, e o uso de uma quantidade predeterminada de perda de peso (por exemplo, 10 a 20% ou acima de 20%) como ponto final é recomendado em muitos guias internacionais.

5 | PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO CLÍNICA E COMPORTAMENTAL EM MODELOS DE DOENÇAS PARASITÁRIAS E FÚNGICAS

Os desfechos humanitários para cada estudo dependerão de fatores que incluem os objetivos, o estágio em que os dados serão obtidos e se um "limite de gravidade" predeterminado foi atingido.

Vários julgamentos precisarão ser feitos, incluindo: a pontuação numérica na qual um animal deve ser submetido à eutanásia ou a cuidados veterinários; se um ou mais fatores devem ser ponderados; e como a duração deve ser levada em consideração (por exemplo, por quanto tempo manter uma pontuação média/alta, mas abaixo do limite). Questões como essas devem ser discutidas pelo pesquisador, veterinário e equipe, com a devida contribuição do comitê de ética para o uso de animais.

5.1 Esporotricose

A esporotricose é uma infecção causada pelo fungo *Sporothrix* e ocorre pela contaminação através do solo, plantas e matéria orgânica contaminada com o fungo. A variação da patogenicidade experimental entre as espécies de *Sporothrix* pode estar relacionada a vários fatores, entre eles a plasticidade do isolado/cepa; diferenças entre

as linhagens de camundongos; interação com o hospedeiro; tamanho do inóculo e via de inoculação. A via intravenosa favorece a infecção sistêmica quando comparada com a via subcutânea de inoculação (TACHIBANA *et al*., 1998). No entanto, a via subcutânea geralmente é a escolhida a fim de mimetizar a infecção natural produzida por mordeduras ou arranhões de gatos.

Em estudos com isolados patogênicos de *Sporothrix*, os camundongos infectados com *S. globosa* não apresentaram lesões esporotricoides e sinais de dor (exceto nódulos no ponto de inoculação) 30 dias após a infecção. O padrão se mantém em camundongos infectados por *S. schenckii*, *S. mexicana* e *S. pallida* até o 21º dia de infecção (inflamação discreta no local da inoculação), porém, as lesões para essas cepas aparecem após 30 dias de infecção, apresentando-se como lesões cutâneas ulceradas ou nodulares mais extensas (CORRÊA-MOREIRA *et al*., 2021).

Em estudos *in vivo* com *S. brasiliensis,* foi observada lesão nodular firme e não aderente no 10º dia pós-infecção por inoculação subcutânea em camundongos BALB/c. O diâmetro das lesões aumentou durante os 21 dias de infecção, no entanto as lesões começaram a diminuir de tamanho a partir do 28º dia e regrediram totalmente no 42º dia (IKEDA *et al*., 2018).

Em infecção experimental por diferentes isolados clínicos de *S. schenckii* (inoculação via coxim plantar), foram detectados nódulos no 11º dia de infecção, e, após o 30º dia, observaram perda de peso, alteração na pelagem e presença de nódulos supurados, atingindo a coxa e testículos. A depender do isolado clínico, a progressão das lesões e do agravamento da doença foi desigual, variando da regressão total das lesões a 20% de mortalidade em 90 dias (BRITO *et al*., 2007). As lesões cutâneas podem ser avaliadas e medidas como um parâmetro clínico para a evolução da gravidade da infecção, porém, ela sozinha pode não ser uma boa medida para determinação do ponto final humanitário devido às grandes diferenças no curso da infecção.

Os sinais clínicos em camundongos, como a inatividade e perda de peso, podem ser empregados como pontos de intervenção clínica, juntamente com o tempo de desenvolvimento das lesões cutâneas. Porém, há divergências a respeito do peso como parâmetro único para o ponto final humanitário nesse modelo animal. Della Terra e colaboradores (2017) usaram a perda de peso como uma medida de agravamento clínico, correlacionando-a com a taxa de mortalidade em camundongos infectados por *S. brasiliensis.* Porém, outros estudos não identificaram variações de peso em camundongos imunocompetentes, diferentemente de animais imunossuprimidos, onde a associação da perda de peso com a mortalidade pode chegar a 100% (DE SEQUEIRA *et al*., 2017; CORRÊA-MOREIRA *et al*., 2021). No entanto, existem problemas práticos com a aferição do peso, que pode não fornecer uma medida precisa devido ao mascaramento encoberto pelo crescimento dos órgãos ou acúmulo de líquido intraperitoneal.

A avaliação do índice esplênico, medida que expressa a hiperplasia esplênica

atribuída à resposta do hospedeiro à presença do fungo, pode ser um bom parâmetro de agravamento da condição de saúde dos animais infectados. As proporções do baço e do peso corporal vêm sendo empregadas em análises *post-mortem*, juntamente com as avaliações histopatológicas. Porém, o emprego de ferramentas de imagens não invasivas, como a tomografia computadorizada volumétrica e ultrassom de alta frequência, pode ser útil na avaliação do baço com maior refinamento, atendendo de forma mais satisfatória o princípio dos 3R's.

5.2 Leishmanioses cutânea e visceral

A Leishmaniose é uma doença infecciosa causada pelo protozoário *Leishmania*. A maioria das infecções por leishmaniose é de origem zoonótica e, em muitos casos, seus reservatórios naturais incluem uma variedade de roedores do deserto, savana e floresta. Assim sendo, os roedores de laboratório são considerados hospedeiros permissivos para a maioria das espécies de *Leishmania* (desde que uma dose alta e/ou via sistêmica de inoculação do parasita seja usada) (HOMMEL *et al*., 1995).

Os modelos experimentais de leishmaniose cutânea em linhagens de roedores geneticamente suscetíveis e resistentes têm sido utilizados para o entendimento dos mecanismos imunológicos implicados na resistência e suscetibilidade à infecção por *Leishmania*.

Os padrões da doença produzidos em animais experimentais infectados com *Leishmania* diferem amplamente de acordo com a espécie de roedor e a espécie de *Leishmania* usada, variando de refratividade completa a susceptibilidade fatal aguda. Assim, esses animais fornecem modelos excelentes para o espectro da doença leishmaniótica que ocorre em humanos e podem ser usados para explorar os parâmetros imunológicos associados a esses desfechos variáveis da doença (por exemplo, cutânea versus visceral, localizada versus disseminada, cura versus não cicatrização) (SACKS, MELBY, 2001).

Os camundongos são, em geral, hospedeiros pobres para espécies do subgênero *Viannia* (*L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*), responsáveis pela maior parte das doenças cutâneas e mucocutâneas nas Américas, embora altas doses de algumas cepas possam ser utilizadas para produzir lesões pequenas e persistentes em camundongos BALB/c (CASTILHO *et al*., 2010). Em contrapartida, os hamsters são altamente suscetíveis a essas espécies, produzindo lesões cutâneas ulcerativas e crônicas (REY *et al*., 1990).

Os locais de inoculação usados com mais frequência são o coxim plantar (pata traseira) e a derme da orelha. Essa última vem sendo associada à infecção natural transmitida por flebotomíneos na pele. A alteração no local do inóculo, em regra, se correlaciona com o número de organismos viáveis contidos na lesão e as vantagens desses locais são o desenvolvimento da lesão pela observação do inchaço da pata ou do diâmetro da lesão da orelha. As aferições sequenciais podem ser feitas na mesma lesão, sem a

necessidade de submeter o animal à eutanásia. O monitoramento do desenvolvimento da lesão pode ser feito semanalmente e, através da contenção do animal, faz-se a medição da largura e espessura da pata na base do quinto dedo do pé usando um paquímetro. O tamanho da lesão da orelha é monitorado medindo o endurecimento em dois diâmetros com um paquímetro.

Nos locais de infecção tradicionais (pata ou orelha) nem sempre ocorre a úlcera, a medição do tamanho da lesão pode ser um procedimento estressante e os animais podem apresentar dificuldades em se alimentar e se locomover. Robledo e colaboradores (2012) inocularam promastigotas de *Leishmania* por via intradérmica (pele dorsal) em hamsters, resultando em lesões crônicas controladas e uma evolução clínica semelhante ao observado em humanos. O grupo estabeleceu o desenvolvimento da infecção aferindo o tamanho da lesão de acordo com a área de endurecimento e a formação de úlceras. Essa abordagem provou ser versátil e de fácil manejo durante a inoculação; no acompanhamento e na caracterização das lesões; execução de tratamentos por diferentes vias e obtenção de amostras clínicas. Com esse método, o grupo evidenciou a manutenção da qualidade de vida do animal quanto à locomoção, busca por comida e água, além das interações sociais.

O local de inoculação também deve ser observado quanto à presença de hiperemia, inflamação, mordedura e ausência de pelos. Além das avaliações das lesões locais, é importante o monitoramento da aparência física (aparência dos pelos, coordenação, temperatura, aspectos dos olhos, posição das orelhas, *grooming*, defecação, presença de líquido ascítico, agitação e desidratação) e do comportamento (acordado, alerta, curioso, atento, permanece com o grupo, procura se alimentar e se hidratar) (ROBLEDO *et al*., 2012). Portanto, assim como a esporotricose, a leishmaniose cutânea em modelo animal precisa ser avaliada quanto à gravidade das lesões no local de inoculação em conjunto com outros parâmetros clínicos-comportamentais e fisiopatológicos, para que se possa refinar o ponto final humanitário pretendido, minimizando a dor e o desconforto nos animais.

A leishmaniose visceral (LV) é causada por infecção com membros do complexo de espécies *Leishmania donovani,* e hamsters e algumas cepas de camundongos suscetíveis (C57BL/6, BALB/c) são os modelos experimentais. O modelo de hamster mimetiza muitas características da LV humana sintomática, incluindo hepatoesplenomegalia e alterações hematológicas. Além disso, é caracterizada pelo aumento progressivo da carga parasitária nos órgãos-alvo e evolui para uma síndrome semelhante à caquexia, que se torna fatal após vários meses de infecção. A LV em camundongos pode não ser fatal, pois apresenta infecção crônica estável do baço levando à esplenomegalia, mas o parasitismo do fígado é lentamente resolvido por respostas imunes efetivas (NIETO *et al*., 2011).

A infecção de camundongos BALB/c ou C57BL/6 com espécies viscerotrópicas de *Leishmania* resulta na multiplicação do parasita no fígado, baço e medula óssea. Durante as primeiras semanas de infecção, os parasitas multiplicam-se rapidamente no fígado; no entanto, quatro semanas depois, os camundongos desenvolvem uma resposta imune Th1

eficaz, eliminando os parasitas, tornando-os resistentes à reinfecção. Enquanto a patologia no fígado é limitada, os parasitas persistem no baço e na medula óssea e a infecção progride por um longo período (KUMAR; NYLÉN, 2012).

Pontos finais humanitários primários e secundários podem ser empregados em estudos de leishmaniose visceral, como a perda de 20% do peso corporal em comparação com o início das infecções; letargia sustentada e/ou diminuição na ingestão alimentar e hídrica (LEWIS *et al*., 2020).

5.3 Malária

A Malária é uma doença causada por um protozoário parasita do gênero *Plasmodium*, transmitido pela picada da fêmea do mosquito *Anophele.* A malária por *Plasmodium falciparum* mata milhões de pessoas por ano em todo o mundo, principalmente devido a duas complicações principais: malária cerebral e anemia grave. Os modelos animais são ferramentas essenciais na pesquisa da malária. As espécies *de P. berghei*, que infecta roedores, e *P. knowlesi*, que infecta primatas, apresentam uma biologia básica semelhante à das espécies infectantes de humanos e, portanto, são comumente usadas em pesquisas. Existem várias razões para o uso de modelos animais para estudar a malária, entre elas, o fato de que os modelos permitem investigar o progresso da doença e estudos de órgãos para os quais o parasita é sequestrado, como baço, pulmões e cérebro.

As infecções causadas por parasitas como *P. berghei* e algumas cepas de *P. vinckei, P. yoelii* e *P. chabaudi* causam infecções letais em camundongos, enquanto outras cepas das mesmas espécies de parasitas são eliminadas após a parasitemia aguda inicial (SANNI *et al*., 2002).

Os modelos de malária cerebral experimental foram desenvolvidos em macacos, ratos e camundongos e, embora nenhum deles mimetize exatamente a síndrome humana, diferentes modelos representam certos aspectos da malária cerebral em humanos. A disponibilidade de diferentes cepas de camundongos, incluindo vários camundongos *knockouts*, permitiu-nos obter uma visão dos mecanismos moleculares envolvidos na patologia cerebral. Várias espécies de *Plasmodium* estão disponíveis para estudo, embora a *P. berghei* seja conhecida por sequestrar para dentro da microvasculatura cerebral.

Os camundongos C57BL/6 infectados com estágios sanguíneos de *P. berghei* ANKA são comumente usados como uma cepa suscetível, e uma elevada porcentagem desses camundongos desenvolve sinais de danos cerebrais entre os dias 5 e 7 de infecção e, subsequentemente, morte nos próximos 2 ou 3 dias. Os sinais de danos cerebrais mais frequentemente encontrados são: ataxia, convulsões, paralisia e coma (DELLAVALLE *et al*., 2014).

A malária cerebral experimental leva a alterações marcantes no comportamento do camundongo 36 horas antes do óbito. Dados obtidos através de testes de triagem

primária SHIRPA (protocolo sistemático e objetivo para análise de fenótipo) confirmaram que os camundongos desenvolvem uma ampla gama de deficiências comportamentais e funcionais no curso progressivo da malária cerebral em comparação com animais sadios (LACKNER *et al.*, 2006).

Além das avaliações de sinais comportamentais/neurológicos, a mensuração da temperatura pode ser um bom preditor de morte na pesquisa de malária cerebral, pois detecta rapidamente uma disfunção na manutenção da temperatura, uma função corporal complexa e essencial. Uma temperatura abaixo de 32°C pode ser usada como indicador de óbito em modelo de malária cerebral (WIESE *et al.*, 2008).

A temperatura abaixo de 30°C foi usada para determinar o desfecho em modelo letal de anemia malárica grave. Camundongos A/J infectados por *P. chabaudi* foram avaliados quanto às alterações na temperatura e o limite de temperatura de 30°C teve sensibilidade de 100% para a predição de letalidade. Porém, alguns animais com temperatura abaixo de 30°C não foram considerados clinicamente moribundos, o que pode superestimar a letalidade no modelo de anemia malárica grave (DELLAVALLE *et al.*, 2014). Portanto, a associação de diferentes parâmetros clínicos e comportamentais é importante para que o valor preditivo do ponto final humanitário seja mais preciso e que medidas de suporte possam ser empregadas para o alívio da dor e do desconforto animal.

5.4 Toxoplasmose

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário parasita intracelular obrigatório com uma gama de hospedeiros extremamente ampla, abrangendo quase todos os animais de sangue quente, incluindo os humanos. É uma zoonose parasitária com distribuição mundial que representa um sério risco para a pecuária e a saúde humana. O *T. gondii* pode ser transmitido horizontalmente, pela ingestão oral de oocistos infecciosos do ambiente e cistos teciduais contidos em carne crua ou mal-cozida, ou verticalmente, pela transmissão transplacentária de taquizoítos.

O *T. gondii* diverge em três linhagens clonais principais, I, II e III, com diferenças marcantes na virulência em camundongos. Os isolados do tipo I são altamente virulentos em camundongos, enquanto os tipos II e III apresentam uma mortalidade dose-dependente (SAEIJ *et al.*, 2006). Embora tradicionalmente seja assumida uma relativa correspondência entre a virulência de cepas de *T. gondii* em camundongos e sua virulência em humanos, existem muitos estudos que apontam diferentes comportamentos do parasita em diferentes hospedeiros.

A via de inoculação e a linhagem dos camundongos podem afetar significantemente a patogênese da infecção. O C57BL/6 se mostrou mais sensível a infecção oral de *T. gondii* de baixa virulência (cepa Me49) e sua mortalidade pode estar associada à necrose grave do intestino. No entanto, a infecção oral em camundongos imunossuprimidos (SCID) induz

a uma infecção assintomática, enquanto os animais infectados pela via intraperitoneal sucumbem mais rapidamente (MEYER *et al*., 2013). As cepas do tipo RH são agudamente virulentas e letais em todas as linhagens de camundongos de laboratório. Ocasionam uma infecção aguda que progride rapidamente pela expansão do número de parasitas e disseminação para todos os órgãos do corpo, levando à morte nos primeiros 10-12 dias (WANG, SIBLEY, 2020). A expansão e disseminação do parasita são características proeminentes da infecção aguda, levando ao choque de citocinas, o que causa a morte do animal.

O grau de virulência das cepas de *Toxoplasma* pode ser determinado pelas alterações comportamentais, morbidade, carga parasitária, além de outros parâmetros de infecção não letal, como perda de peso, análise de anticorpos IgG, níveis de haptoglobina no soro e capacidade cistogênica. Devido ao interesse nas alterações comportamentais dos hospedeiros infectados por *T. gondii*, vários autores estudaram o tropismo tecidual no cérebro de roedores infectados e sua relação com as alterações comportamentais nos animais.

Afonso e colaboradores (2012) propuseram que combinações específicas de distribuição de cistos no cérebro podem influenciar mudanças comportamentais específicas (mudanças no risco/medo incondicionado). Além disso, a infecção pode diminuir drasticamente o ato de autolimpeza, principalmente durante a fase aguda da infecção, sendo este considerado um indicador de bem-estar correlacionado com a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.

Os sinais clínicos ocasionados pontuados por Arranz-Solis e colaboradores (2015) podem ser empregados no modelo de infecção pela cepa Me49 de *T. gondii* como: pelagem eriçada; arqueamento do dorso; diarreia; conjuntivite; dispneia; perda perceptível de peso ou condição corporal agravada; alteração da temperatura; ascite; e sinais neurológicos/comportamentais como a diminuição da atividade, relutância em se mover, desequilíbrio ao andar, paralisia dos membros posteriores, andar em círculos ou inclinar a cabeça.

No modelo de infecção ocasionado pela cepa RH de *T. gondii,* podem ser observados os seguintes sinais clínicos: perda de peso; taquipneia; dispneia; alteração da temperatura; pelagem eriçada e ascite.

As diferentes vias de infecção do parasito levam a diversas manifestações clínicas nos hospedeiros, e várias dessas formas clínicas são estudadas em modelo murino. O entendimento da virulência nas diversas linhagens de camundongos é extremamente necessário para que o escore de avaliação clínico-comportamental compreenda essas diferenças. A avaliação de proteínas de fase aguda e o uso de métodos de imagem para avaliação dos cistos e do cérebro dos animais podem ser importantes ferramentas complementares para uma melhor predição de morbidade e letalidade.

5.5 Esquistossomose

A esquistossomose é uma doença parasitária crônica causada pela infecção por *Schistosoma.* Os parasitas residem nas veias mesentéricas, onde depositam centenas de ovos por dia. A patobiologia da esquistossomose hepato-intestinal está principalmente associada a lesões teciduais causadas por ovos migratórios de esquistossomose que não conseguem atingir o lúmen intestinal, ficando presos nos sinusoides hepáticos e na parede intestinal, estimulando a formação de granulomas ricos em colágeno acompanhados de fibrose periportal e hipertensão portal.

O modelo de camundongo infectado por *S. mansoni* oferece uma possibilidade única de avaliar de forma acelerada o desenvolvimento da infecção esquistossomose, que pode levar décadas para se desenvolver em ambientes clínicos (PEREIRA *et al.*, 2016). O tamanho do granuloma em camundongos infectados diminui ao longo do tempo de infecção, levando a uma diminuição da obstrução vascular, resultando na redução do tamanho do órgão e, consequentemente, da fisiopatologia. A maioria dos animais de laboratório desenvolve sinais fisiopatológicos como pelos eriçados, diminuição da atividade e eosinofilia acentuada durante os primeiros 2 meses de infecção.

Nono e colaboradores (2021) avaliaram os camundongos infectados por *S. mansoni* diariamente através da aferição do peso e os sinais de dor e distresse. Além desses aspectos, sinais mais específicos também foram relatados, como diarreia, fraqueza, marcha vacilante e comportamento de isolamento. Animais com perda de peso significante (20%), perda de força ou diarreia com sangue aparente foram submetidos à eutanásia. A ocorrência simultânea de 2 dos 3 sinais relatados acima por 24-42h foi também determinante para a retirada do animal do experimento.

Roedores usados em estudos de longo prazo podem desenvolver uma série de condições clínicas observáveis manifestadas por sinais clínicos, indicando condições irreversíveis que podem causar dor e desconforto aos animais. Esses sinais clínicos e outros parâmetros mensuráveis podem, portanto, servir como ponto final humanitário. Por exemplo, a perda significativa de peso corporal pode indicar comprometimento grave e irreversível do fígado, rim ou outro órgão. O aumento da frequência de pesagem dos animais até o final do estudo tem sido recomendado para aprimorar a detecção de animais com doenças crônicas. Alterações fisiológicas, bioquímicas e outros biomarcadores têm sido sugeridos como desfechos potencialmente mais objetivos e reprodutíveis do que os sinais clínicos.

6 | EXEMPLO DE FICHA DE PONTUAÇÃO PARA ESTUDOS EM DOENÇAS PARASITÁRIAS

a. Ficha 1- Acompanhamento diário

FICHA DE ACOMPANHAMENTO DIÁRIO				
Nº DO ANIMAL: **DATA:**	**Dia 1**	**Dia 2**	**Dia 3**	**Dia 4**
ASPECTO				
Peso corporal				
Estado do pelo				
Alteração da temperatura corporal				
Expressão facial				
ALTERAÇÃO COMPORTAMENTAL				
Manuseamento				
LOCOMOÇÃO				
Paralisia de membros				
Postura (arqueamento do corpo)				
Força ao agarrar				
INDICADORES ESPECÍFICOS DOS PROCEDIMENTOS *				
Convulsão				
Coma				
Ascite				
PONTUAÇÃO TOTAL				
Outras observações				
*Preencher com sinais específicos da doença				

b. Ficha 2: Escore clínico-comportamental

ESCORE CLÍNICO-COMPORTAMENTAL	
ASPECTO	**PONTUAÇÃO**
PESO CORPORAL	
5-10% de perda de peso	1
11-15% de perda de peso	2
16-20% de perda de peso	3
20% + de perda de peso	E
ESTADO DO PELO	
Ligeira piloereção	1
Piloereção moderada	2
Piloereção intensa	3

ALTERAÇÃO DE TEMPERATURA CORPORAL **Faixa normal: 36,5ºC (35ºC -37,9ºC)**	
Até 2ºC acima da faixa normal	1
Até 3ºC acima da faixa normal	2
> 3º da faixa normal	E
Hipotermia < 35ºC	E
EXPRESSÃO FACIAL	
Redução da órbita ocular até 50% com ou sem secreção	2
Surgimento de rugas entre a narina e a comissura medial do olho do mesmo lado	3
Rotação das orelhas para fora ou para trás, aumentando o espaço entre elas	3
Quando o formato do globo ocular passar de redondo a elíptico com surgimento de ruga ao redor dos olhos e redução de 50% da área ocular ou mais com ou sem secreção	E
ALTERAÇÃO COMPORTAMENTAL	
Parar de correr	1
Estacionário sem ser provocado	2
Estacionário mesmo provocado	E
PARALISIA DOS MEMBROS	
Paralisia de um membro posterior	2
Paralisia dos 2 membros posteriores	E
Imobilidade > 24 h	E
POSTURA (ARQUEAMENTO DO CORPO)	
Leve	1
Moderado	2
Intenso	3
FORÇA AO AGARRAR	
Perda de 25% da força	1
Perda de 50% da força	2
Perda de 75% da força	3
Perda de 100% da força	E
INDICADORES ESPECÍFICOS DE PROCEDIMENTOS	
Convulsão	E
Coma	E
Ascite	E
Tomar as seguintes ações de acordo com a pontuação total de escores obtidos na tabela acima	**PONTUAÇÃO**
Aumentar a frequência do monitoramento dos animais para 2 vezes ao dia	4
Implementar, se possível, intervenção clínica de cuidados veterinários	5 - 7
Eutanásia	8
Eutanásia - Quaisquer desses parâmetros sozinhos indicam grandes alterações fisiológicas com indicativo de dor e distresse ao animal, levando a intenso sofrimento.	E

REFERÊNCIAS

ADAMSON, T. W.; DIAZ-AREVALO, D.; GONZALEZ, T. M.; LIU, X.; KALKUM, M. 2013. Hypothermic endpoint for an intranasal invasive pulmonary aspergillosis mouse model. **Comp Med** 63:477–481.

AFONSO, C.; PAIXÃO, V. B.; COSTA, R. M. Chronic Toxoplasma infection modifies the structure and the risk of host behavior. **PLoS One**. 2012;7(3):e32489.

ARRANZ-SOLÍS, D.; AGUADO-MARTÍNEZ, A.; MÜLLER, J.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ORTEGA-MORA, L. M.; HEMPHILL, A. Dose-dependent effects of experimental infection with the virulent Neospora caninum Nc-Spain7 isolate in a pregnant mouse model. **Vet Parasitol**. 2015 Jul 30;211(3-4):133-40.

BRITO, M. M.; CONCEIÇÃO-SILVA, F; MORGADO, F. N.; RAIBOLT, P. S.; SCHUBACH, A.; SCHUBACH, T. P.; SCHÄFFER, G. M.; BORBA, C. M. Comparison of virulence of different Sporothrix schenckii clinical isolates using experimental murine model. **Med Mycol**. 2007 Dec;45(8):721-9.

BRØNSTAD, A.; NEWCOMER, C. E.; DECELLE, T.; EVERITT, J. I.; GUILLEN, J.; LABER, K. Current concepts of Harm-Benefit Analysis of Animal Experiments - Report from the AALAS-FELASA Working Group on Harm-Benefit Analysis - Part 1**. Lab Anim.** 2016 Jun;50(1 Suppl):1-20.

CASTILHO, T. M.; GOLDSMITH-PESTANA, K.; LOZANO, C.; VALDERRAMA, L.; SARAVIA, N. G.; MCMAHON-PRATT, D. Murine model of chronic L. (Viannia) panamensis infection: role of IL-13 in disease. **European journal of immunology**. 2010; 40:2816–2829

COLBY, L. A.; QUENEE, L. E.; ZITZOW, L. A. Considerations for Infectious Disease Research Studies Using Animals. **Comp Med**. 2017 Jun 1;67(3):222-231.

CORRÊA-MOREIRA, D.; MENEZES, R. C.; ROMEO, O.; BORBA, C. M.; OLIVEIRA, M. M. E. Avaliação Clínica e Anatomopatológica de Modelos Murinos BALB/c Infectados com Isolados de Sete Espécies Patogênicas de Sporothrix. **Patógenos**. 2021; 10(12):1647.

DEANS, C.; WIGMORE, S. J. 2005. Systemic inflammation, cachexia, and prognosis in patients with cancer. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care** 8:265–269.

DELLA TERRA, P. P.; RODRIGUES, A. M.; FERNANDES, G. F.; NISHIKAKU, A. S.; BURGER, E.; DE CAMARGO, Z. P. Exploring virulence and immunogenicity in the emerging pathogen Sporothrix brasiliensis. **PLoS Negl. Trop. Dis**. 2017, 11, e0005903.

DELLAVALLE, B.; KIRCHHOFF, J.; MARETTY, L.; CASTBERG, F. & KURTZHALS, J. (2014). Implementation of minimally invasive and objective humane endpoints in the study of murine Plasmodium infections. **Parasitology**, 141(12), 1621-1627.

DE SEQUEIRA, D. C. M.; MENEZES, R.; OLIVEIRA, M. M. E.; ANTAS, P. R. Z.; DE LUCA, P. M.; DE OLIVEIRA-FERREIRA, J.; BORBA, C. D. M. Experimental Hyalohyphomycosis by Purpureocillium lilacinum: Outcome of the Infection in C57BL/6 Murine Models. **Front. Microbiol**. 2017, 8, 1617.

FUX, C. A.; SHIRTLIFF, M.; STOODLEY, P.; COSTERTON, J. W. 2005. Can laboratory reference strains mirror 'real-world' pathogenesis? **Trends Microbiol** 13:58–63.

GAVIN, H. E.; SATCHELL, K. J. F. Surface hypothermia predicts murine mortality in the intragastric *Vibrio vulnificus* infection model. **BMC Microbiol 17,** 136 (2017).

GERDTS, V.; LITTEL-VAN DEN HURK, S.; GRIEBEL, P. J.; BABIUK, L. A. Use of animal models in the development of human vaccines. **Future Microbiology** 2007 2:6, 667-675.

HANKENSON, F. C.; RUSKOSKI, N.; VAN SAUN, M.; YING, G. S.; OH, J.; FRASER, N. W. 2013. Weight loss and reduced body temperature determine humane endpoints in a mouse model of ocular herpesvirus infection. **J Am Assoc Lab Anim Sci** 52:277–285.

HOMMEL, M.; JAFFE, C. L.; TRAVI, B.; MILON, G. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 1995;89:55–73.

IKEDA, M.; DE ALMEIDA, J. R. F.; JANNUZZI, G. P.; CRONEMBERGER-ANDRADE, A.; TORRECILHAS, A. C. T.; MORETTI, N. S.; DA CUNHA, J. P. C.; DE ALMEIDA, S. R.; FERREIRA, K. S. Extracellular Vesicles from Sporothrix brasiliensis are an Important Virulence Factor that Induce an Increase in Fungal Burden in Experimental Sporotrichosis. **Frontiers in Microbiology**. Vol.9, 2018.

KAO, P. C.; SHIESH, S. C.; WU, T. J. 2006. Serum C-reactive protein as a marker for wellness assessment. **Ann Clin Lab Sci** 36:163–169.

KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Front Immunol.** 2012;3:251.

LACKNER, P.; BEER, R.; HEUSSLER, V.; GOEBEL, G.; RUDZKI, D.; HELBOK, R.; TANNICH, E.; SCHMUTZHARD, E. (2006), Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, 32: 177-188. https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2006.00706.x

LEWIS, M. D.; PAUN, A.; ROMANO, A.; LANGSTON, H.; LANGNER, C. A.; MOORE, I. N.; BOCK, K. W.; FRANCISCO, A. F.; BRENCHLEY, J. M.; SACKS, D. L. Fatal progression of experimental visceral leishmaniasis is associated with intestinal parasitism and secondary infection by commensal bacteria, and is delayed by antibiotic prophylaxis. **PLoS Pathog**. 2020 Apr 13;16(4):e1008456.

MEYER, D. J.; ALLAN, J. E.; BEAMAN, M. H. Effect of route of infection on outcome of Toxoplasma gondii infection in hu-PBL SCID mice. **Eur J Microbiol Immunol (Bp**). 2013 Mar;3(1):28-35.

NIETO, A.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; ORDEN, J. A.; DE LA FUENTE, R.; MADRID-ELENA, N.; CARRIÓN, J. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniosis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. **Veterinary Research**. 2011;42(1):39.

NONO, J. K.; MPOTJE, T.; MOSALA, P.; AZIZ, N. A.; MUSAIGWA, F.; HLAKA, L.; SPANGENBERG, T.; BROMBACHER, F. Praziquantel Treatment of Schistosoma mansoni Infected Mice Renders Them Less Susceptible to Reinfection. **Front Immunol**. 2021 Dec 10;12:748387.

OLFERT, E. D.; GODSON, D. L. Humane Endpoints for Infectious Disease Animal Models, **ILAR Journal**, Volume 41, Issue 2, 2000, Pages 99–104.

PEREIRA, T. A.; SYN, W. K.; AMÂNCIO, F. F.; CUNHA, P. H.; CAPORALI, J. F.; TRINDADE, G. V.; SANTOS, E. T.; SOUZA, M. M.; ANDRADE, Z. A.; WITEK, R. P.; SECOR, W. E.; PEREIRA, F. E.; LAMBERTUCCI, J. R.; DIEHL, A. M. Osteopontin Is Upregulated in Human and Murine Acute Schistosomiasis Mansoni. **PLoS Negl Trop Dis** (2016) 10:e0005057.

REY, J. A.; TRAVI, B.; VALENCIA, A. Z.; SARAVIA, N. G. Infectivity of the subspecies of the *Leishmania braziliensis* complex in vivo and in vitro. **Am. J. Trop. Med. Hyg**. 1990; 43:89–193.

RIDKER, P. M. 2007. Inflammatory biomarkers and risks of myocardial infarction, stroke, diabetes, and total mortality: implications for longevity. **Nutr Rev** 65:S253–S259.

ROBLEDO, S. M.; CARRILLO, L. M.; DAZA, A.; RESTREPO, A. M.; MUÑOZ, D. L.; TOBÓN, J.; MURILLO, J. D.; LÓPEZ, A.; RÍOS, C.; MESA, C. V.; UPEGUI, Y. A.; VALENCIA-TOBÓN, A.; MONDRAGÓN-SHEM, K.; RODRÍGUEZ, B.; VÉLEZ, I. D. Cutaneous leishmaniasis in the dorsal skin of hamsters: a useful model for the screening of antileishmanial drugs. **J Vis Exp.** 2012 Apr 21;(62):3533.

SACKS, D. L.; MELBY, P. C. Animal models for the analysis of immune responses to leishmaniasis. **Curr Protoc Immunol**. 2001 May;Chapter 19:Unit 19.2.

SAEIJ, J. P.; BOYLE, J. P.; COLLER, S.; TAYLOR, S.; SIBLEY, L. D.; BROOKE-POWELL, E. T.; AJIOKA, J. W.; BOOTHROYD, JC. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. **Science**. 2006 Dec 15;314(5806):1780-3.

SANNI, L. A.; FONSECA, L. F.; LANGHORNE, J. Mouse models for erythrocytic-stage malaria. **Methods Mol Med.** 2002;72:57-76.

TACHIBANA, T.; MATSUYAMAT, MITSUYAMA, M. Characteristic infectivity of *Sporothrix schenckii* to mice depending on routes of infection and inherent fungal pathogenicity**. Med Mycol,** 1998, vol. 36 (p. 21-27).

TAKAYAMA-ITO, M.; LIM, C. K.; NAKAMICHI, K.; KAKIUCHI, S.; HORIYA, M.; POSADAS-HERRERA, G.; KURANE, I.; SAIJO, M. Reduction of animal suffering in rabies vaccine potency testing by introduction of humane endpoints. **Biologicals**, 2017, Mar;46:38-45.

TANKERSLEY, C. G.; IRIZARRY, R.; FLANDERS, S. E.; RABOLD, R.; FRANK, R. 2003. Unstable heart rate and temperature regulation predict mortality in AKR/J mice. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 284:R742–R750.

TOTH, L. A. 2000. Defining the moribund condition as an experimental endpoint for animal research. **ILAR J** 41:72–79.

WANG, Q.; SIBLEY, L. D. Assays for Monitoring Toxoplasma gondii Infectivity in the Laboratory Mouse. **Methods Mol Biol**. 2020; 2071:99-116.

WIESE, L.; HEMPEL, C.; PENKOWA, M.; KIRKBY, N.; KURTZHALS, J. A. Recombinant human erythropoietin increases survival and reduces neuronal apoptosis in a murine model of cerebral malaria. **Malar J**. 2008 Jan 7;7:3.

CAPÍTULO 7

ESTUDOS EM INFECÇÕES EXPERIMENTAIS: ARBOVIROSES

Data de aceite: 03/07/2023

Mônica da Silva Nogueira
Centro de Experimentação Animal, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz,
Rio de Janeiro/RJ
ORCID 0009-0006-5793-3743

Yuli Rodrigues Maia de Souza
Laboratório de Medicina Experimental e Saúde, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz,
Rio de Janeiro/RJ
ORCID 0000-0002-6202-1961

1 | INTRODUÇÃO

Os camundongos são modelos animais bastante utilizados na pesquisa científica, entre outros fatores, devido ao seu baixo custo de aquisição e manutenção e pela maior facilidade de manejo.

Na literatura, são descritos estudos com arbovírus que utilizam camundongos heterogênicos, como o Swiss Webster, ou os isogênicos, como o C57BL/6 e o BALB/c. Esses últimos têm aplicabilidade interessante, pois diferem em seus padrões de resposta imunológica. Os camundongos C57BL/6 possuem uma resposta imunológica predominantemente do tipo Th1 e os camundongos BALB/c possuem uma resposta imunológica predominantemente do tipo Th2 (MACIEL *et al.*, 2015). Em relação à utilização desse modelo para o estudo de arboviroses, eventualmente é encontrada uma limitação devido à resistência de camundongos imunocompetentes, pois esses vírus, por vezes, são incapazes de transpor a barreira imunológica inata desses organismos. Ainda assim, é possível explorar a infecção por arbovírus em camundongos imunocompetentes utilizando-se diferentes vias de inoculação ou, ainda, em animais jovens, nos quais o sistema imunológico ainda não é capaz de abortar a infecção. Quando essas abordagens não são suficientes, uma alternativa envolve a utilização de camundongos imunodeprimidos deficientes para o receptor de interferon do tipo I, tal como o A129, e dos tipos I e II, tal como o AG129. Abordaremos, aqui, características e particularidades do uso de camundongos em infecções com o vírus Zika, com o vírus

da Febre amarela selvagem e vacinal e com o vírus da Dengue.

2 | ARBOVÍRUS E ENSAIOS EXPERIMENTAIS

O vírus Zika (ZKV), o vírus da dengue (DENV) e o vírus da febre amarela são membros da família Flaviviridae, do gênero Flavivirus. A disseminação global e as complicações infecciosas os tornaram flavivírus de grande interesse em saúde pública. Existem pelo menos quatro DENV intimamente relacionados, mas sorologicamente distintos, designados como os sorotipos DENV 1 a 4. Existe proteção cruzada transitória e fraca entre os quatro sorotipos de DENV, de modo que indivíduos que vivem em uma área onde o DENV é endêmico podem ser infectados até quatro vezes. O ZKV e o DENV se espalharam pelos trópicos da África, Ásia, Pacífico e Américas com seus mosquitos vetores *Aedes* aegypti e A. albopictus. Tanto a infecção por ZKV quanto por DENV podem produzir um amplo espectro de doenças com muitas infecções assintomáticas ou subclínicas. O potencial do ZKV de causar anormalidades do sistema nervoso central fetal, restrição de crescimento e morte exigiu o teste de ZKV em gestantes potencialmente expostas (WILSON, *et al.*, 2017).

a. Vírus Zika

O vírus Zika, transmitido por mosquito (ZIKV), geralmente causa uma doença leve e autolimitada conhecida como febre Zika, que geralmente é acompanhada de erupção cutânea maculopapular, dor de cabeça e mialgia. Os camundongos deficientes em receptores α, β e ɣ de interferon (camundongos AG129) são altamente suscetíveis à infecção por ZIKV, agravando-se dentro de sete a oito dias, com rápida disseminação virêmica observada em órgãos viscerais e cérebro. Mas o ZIKV só foi associado a patologias graves no cérebro e músculo, apresentando esses resultados em todas as vias de desafio, idade dos animais e dose de inóculo. Dessa forma, representam um modelo de camundongo para ZIKV que não depende da adaptação do ZIKV à passagem intracerebral em camundongos (ALIOTA *et al.*, 2016).

Camundongos adultos imunocompetentes não são bons modelos experimentais para o vírus Zika, pois o ZIKV, quando inoculado pelas vias intramuscular, intraperitoneal, intravenosa ou subcutânea, não consegue suprimir de forma eficiente a via de sinalização STAT2 dependente de interferon, sendo, então, esse animal resistente à infecção por ZIKV nessas condições (GORMAN *et al.*, 2018). A alternativa que cinge o uso de camundongos em estudos para infecção do vírus Zika envolve a inoculação do vírus em camundongos neonatos competentes, a inoculação do ZIKV pela via cerebral de camundongos adultos imunocompetentes ou, ainda, a utilização de camundongos imunossuprimidos, como o A129 e o AG129. Camundongos imunocompetentes neonatos inoculados pela via intraperitoneal ou subcutânea desenvolvem ataxia, tremores, convulsões e quadro

de encefalite, por vezes acompanhado de morte. A inoculação do ZIKV no cérebro de camundongos imunocompetentes adultos leva a uma infecção fatal com acometimento do sistema nervoso. Em camundongos imunossuprimidos inoculados pelas vias subcutânea, intraperitoneal e intradérmica, observam-se perda de peso, postura curvada, tremores e acometimento do sistema nervoso central. Os camundongos AG129 são mais suscetíveis à morte pela infecção do ZIKV quando comparados aos A129 (MORRISON; DIAMOND, 2017).

Os camundongos devem ser pesados e monitorados diariamente quanto aos sinais da doença e deve-se realizar o ponto final humanitário quando os camundongos perderem 20% de seu peso corporal (JOHNSON *et al*., 2020).

b. <u>Vírus da Febre amarela</u>

Assim como observado com o vírus Zika, camundongos adultos imunocompetentes heterogênicos ou isogênicos não são susceptíveis a infecção pelo vírus selvagem (VFA) ou vacinal (VFA-17D) pelas vias intramuscular, intraperitoneal, intravenosa ou subcutânea. Para proceder com quaisquer investigações clínicas com camundongos jovens e adultos, é necessário valer-se de vias de inoculação em que as partículas virais acessem diretamente o sistema nervoso central, ou utilizar camundongos neonatos por qualquer via de inoculação, ou, ainda, considerar a utilização de camundongos imunossuprimidos.

Quando se utiliza uma via onde as partículas virais vacinais tenham acesso direto ao sistema nervoso central, como a inoculação intracerebral, os animais, ainda que imunocompetentes, desenvolvem a forma neurotrópica da febre amarela com altíssima taxa de mortalidade entre 7-8 dias após a inoculação (ERICKSON; PFEIFFER, 2015). Em se tratando da infecção de camundongos neonatos, observa-se uma evolução fatal do quadro, completamente diferente da resistência encontrada em animais adultos. Camundongos adultos deficientes para o receptor de interferons (A129 e AG129) têm grande valia quando há interesse que os animais desenvolvam a forma viscerotrópica da febre amarela, ou, ainda, para avaliar os efeitos da infecção em organismos imunodeprimidos (especialmente com o vírus vacinal), ou, ainda, quando é necessário utilizar as vias de inoculação às quais os camundongos competentes são resistentes (intramuscular, intraperitoneal, intravenosa ou subcutânea) (MEIER *et al*., 2009).

A forma neurotrópica da febre amarela em camundongos é caracterizada por uma encefalite aguda na qual os animais apresentam sinais de dor, como postura curvada, pelos eriçados, respiração irregular e letargia; também apresentam sinais que refletem os danos neurológicos, tais como a perda da força das patas traseiras, o que pode evoluir para uma paralisia parcial ou total, diminuição ou perda da reatividade das forças de preensão e suspensão pela cauda e, ainda, descarga ocular (ERICKSON; PFEIFFER, 2015). A forma viscerotrópica nesses animais caracteriza-se pelo acometimento do fígado, baço

e hemorragia intestinal. Os sinais clínicos iniciam-se entre 3 e 4 dias após a inoculação e em parte assemelham-se aos sinais presentes na forma neurotrópica: postura curvada, pelos eriçados, respiração irregular e letargia. A morte dos animais também ocorre entre 7-8 dias após a inoculação. Em ambos os quadros de desenvolvimento da febre amarela, neurotrópica e viscerotrópica, a perda de peso está presente como consequência do quadro moribundo em que o animal se situa (MEIER *et al.*, 2009).

c. <u>Vírus da Dengue</u>

Diferente dos arbovírus apresentados até aqui, o vírus da Dengue é capaz de causar a infecção em camundongos adultos imunocompetentes pela via intraperitoneal. Os animais são virêmicos e apresentam os sinais clínicos da Dengue, como trombocitopenia, hemorragia do baço, dano hepático e aumento da produção de interferon (YAUCH; SHRESTA, 2008).

A dengue é uma doença viral sistêmica aguda que representa um transtorno público crescente, atualmente considerado como a doença mais relevante transmitida por artrópodes. O vírus, concentrado em regiões tropicais e subtropicais do mundo, é transmitido principalmente por mosquitos *Aedes*, que colocam em risco de infecção aproximadamente metade da população mundial. As infecções podem ser oligossintomáticas ou resultar em uma doença leve semelhante à gripe. Além disso, complicações da dengue afetando órgãos e sistemas específicos, como cérebro, nervos periféricos, fígado, pulmão e coração, foram recentemente relatadas. Como não existem alternativas antivirais eficazes ou uma vacina disponível para controlar a infecção pelo vírus da dengue, atualmente, as contramedidas dependem basicamente do controle vetorial, de programas educativos e tratamentos sintomáticos. (OLIVEIRA, E. R. A., *et al.*, 2016).

3 | PONTO FINAL HUMANITÁRIO

Para que seja estabelecido o ponto final humanitário, é necessário que seja considerado um equilíbrio entre alcançar o objetivo científico e poupar o animal de sofrimento.

Deve-se considerar que existe uma variabilidade relacionada à observação do avaliador, bem como na interpretação dessas observações. Os sinais clínicos fornecem um julgamento objetivo da dor e angústia do animal, no entanto, para que esses sinais sejam fidedignos, os observadores devem ter bons padrões de observação e conhecimento do que é considerado normal para aquela espécie animal e linhagem. Uma boa estratégia de avaliação é envolver todos aqueles que atuam no trabalho de pesquisa com animais, porque cada um trará um foco diferente: os tratadores, com sua experiência prática; os veterinários, com conhecimento clínico; e os pesquisadores, com o conhecimento dos potenciais efeitos de seus procedimentos científicos. Recentemente, o esquema de pontuação para animais

foi consideravelmente reforçado, tornando-se mais rigoroso e com menos margem para variações de interpretações dos observadores. A contribuição do pesquisador é essencial para determinar o estágio inicial em que o objetivo científico foi alcançado. O uso de planilhas de pontuação fornece informações cronologicamente organizadas.

Os efeitos adversos experimentados pelos animais durante a pesquisa vão além da dor e podem incluir desconforto devido a alguns fatores, como, por exemplo, a separação dos grupos e o isolamento. No entanto, antes que quaisquer desses sinais possam ser observados, é preciso ser capaz de reconhecer o bem-estar dos animais (MORTON, 2020).

4 | PLANILHA DE ESCORE CORPORAL

Não é possível ter uma lista única e generalizada para todos os sinais clínicos que ocorrerão em todos os experimentos. As planilhas de pontuação devem ser elaboradas especificamente para cada procedimento experimental.

Um estudo piloto deve ser realizado para a melhor definição do ponto final humanitário. Sendo assim, o ponto final já estará definido quando os experimentos começarem. Os sinais observáveis serão o peso corporal e a aparência do animal, como a pelagem e a postura.

Abaixo, sugerimos um checklist que pode ser usado e adaptado para cada experimento ou modelo:

Acompanhamento clínico/comportamental*			
Avaliador: ______________________________ **Horário (turno):** _____________			
Data:____/____/___	**Animal**___	**Animal**___	**Animal**___
Dia pós-infecção/desafio	**Caixa** ___	**Caixa** ___	**Caixa** ___
Perda de peso de 5 a 10% Perda de peso de 10 a 15% Perda de peso de 15 a 20% Perda de peso ≥ 20%	( ) 3 ( ) 6 ( ) 9 ( ) 12	( ) 3 ( ) 6 ( ) 9 ( ) 12	( ) 3 ( ) 6 ( ) 9 ( ) 12
Temperatura normal Hipertermia Hipotermia	( ) 0 ( ) 6 ( ) 9	( ) 0 ( ) 6 ( ) 9	( ) 0 ( ) 6 ( ) 9
Respiração normal Respiração aumentada Respiração abdominal	( ) 0 ( ) 6 ( ) 12	( ) 0 ( ) 6 ( ) 12	( ) 0 ( ) 6 ( ) 12
Postura corporal Normal Curvamento leve Curvamento moderado Curvamento grave	 ( ) 0 ( ) 6 ( ) 9 ( ) 12	 ( ) 0 ( ) 6 ( ) 9 ( ) 12	 ( ) 0 ( ) 6 ( ) 9 ( ) 12
Olhos abertos > 75% Olhos com abertura de 50 a 75% Olhos com abertura de 25 a 50% Olhos c/ abertura < 25%	( ) 0 ( ) 6 ( ) 9 ( ) 12	( ) 0 ( ) 6 ( ) 9 ( ) 12	( ) 0 ( ) 6 ( ) 9 ( ) 12

Mobilidade - ativo Mobilidade reduzida Relutante em se movimentar Ataxia/marcha vacilante Incapaz de se movimentar	( ) 0 ( ) 3 ( ) 3 ( ) 6 ( ) 12	( ) 0 ( ) 3 ( ) 3 ( ) 6 ( ) 12	( ) 0 ( ) 3 ( ) 3 ( ) 6 ( ) 12
Pelagem normal (lisa e brilhante) Higiene Reduzida Piloereção discreta Piloereção notória	( ) 0 ( ) 3 ( ) 3 ( ) 9	( ) 0 ( ) 3 ( ) 3 ( ) 9	( ) 0 ( ) 3 ( ) 3 ( ) 9
Teste de suspensão pela cauda Reativo Pouco reativo Não reativo	( ) 0 ( ) 6 ( ) 9	( ) 0 ( ) 6 ( ) 9	( ) 0 ( ) 6 ( ) 9
Teste de força de preensão dos membros traseiros Reativo Pouco reativo Não reativo	( ) 0 ( ) 6 ( ) 9	( ) 0 ( ) 6 ( ) 9	( ) 0 ( ) 6 ( ) 9
Paralisia dos membros traseiros Unilateral Bilateral	( ) 6 ( ) 9	( ) 6 ( ) 9	( ) 6 ( ) 9
ESCORE TOTAL - Observação 01 vez ao dia com escore até 24 - Observação 02 vezes ao dia com escore ≥ 24 - EUTANÁSIA – escore total ≥ 36 - EUTANÁSIA – qualquer item sozinho pontuar 12			
* Sistema de pontuação para a finalização humanitária nas pesquisas com arbovirose experimental do Centro de Experimentação Animal do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz. Tabela adaptada do Sistema de Pontuação de Intervenção Murina (MISS 3) de Koch *et al.* (2016) e Nunamaker (2013).			

Considerações para a avaliação clínica dos animais:

1. Marque um (x) em cada critério observado e, ao final, realize o somatório das pontuações.
2. Recomendamos que 1 (um) ou no máximo 2 (dois) pesquisadores realizem a avaliação dos animais durante o experimento.
3. Os animais devem ser avaliados diariamente após o procedimento de desafio/infecção.
4. A frequência de monitoramento será intensificada de acordo com a pontuação de avaliação clínica.
5. Animais com score total de 36 ou mais devem ser submetidos à EUTANÁSIA.
6. Animais com qualquer item de escore 12 também devem ser submetidos à EUTANÁSIA, independente do escore total.

a. Instruções gerais:

1. Inspeção visual deve ser realizada 01 (uma) vez ao dia.
2. Peso e temperatura devem ser registrados 01 (uma) vez ao dia.
3. Testes de força e de suspensão pela cauda devem ser realizados 01 (uma) vez ao dia.
4. Aumento da inspeção visual para 02 (duas) vezes ao dia quando o escore total ultrapassar 24 ou ocorrer 10 % de perda de peso corporal basal em 24 horas.

b. Avaliação do Peso:
1. O peso é aferido em balança analítica.
2. O percentual de perda de peso será relacionado ao peso no tempo zero, isto é, peso avaliado momento antes do procedimento.

c. Aferição da temperatura
1. A temperatura é aferida através de termômetro infravermelho próprio para animais na região ventral. Caso não possua um termômetro próprio para animais, desconsidere esse parâmetro.
2. A temperatura normal de um camundongo varia entre 36.5 °C a 38 °C.
3. A HIPERTERMIA pode ocorrer nas primeiras 24 horas após o procedimento e será considerada em até 3 °C acima da temperatura normal. Acima de ≥ 3 °C, o animal será submetido à EUTANÁSIA.
4. A HIPOTERMIA é considerada crítica nos animais e temperaturas abaixo de 35 °C serão consideradas como um limite para a EUTANÁSIA.

d. Teste de suspensão pela cauda
1. Para o teste, os animais são suspensos pela base da cauda por um período curto (5 segundos).
2. O teste de suspensão pela cauda demonstra a capacidade do animal em tentar retornar ao estado normal, com a tentativa voltar a cabeça em direção à cauda suspensa.
3. Animais com danos psicomotores ficam menos reativos à suspensão da cauda.

e. Teste de força de preensão
1. O teste consiste em suspender o animal pela base da cauda e colocar o dedo indicador do avaliador nas patas TRASEIRAS a fim de estimular o animal a segurar a grade.
2. Para este protocolo, o teste de força é realizado para averiguar a capacidade das patas TRASEIRAS em realizar o movimento de preensão.

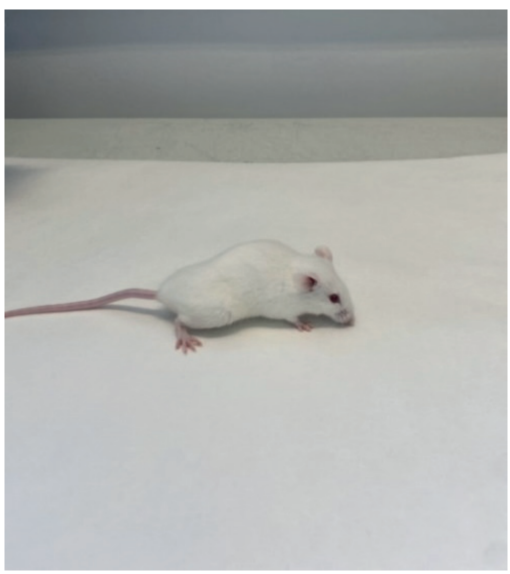


Figura 1: Camundongo com dorso moderadamente arqueado

Fonte: Monica Nogueira, IOC/Fiocruz, 2021.



Figura 2: Camundongo com dorso gravemente arqueado

Fonte: Monica Nogueira, IOC/Fiocruz, 2021.

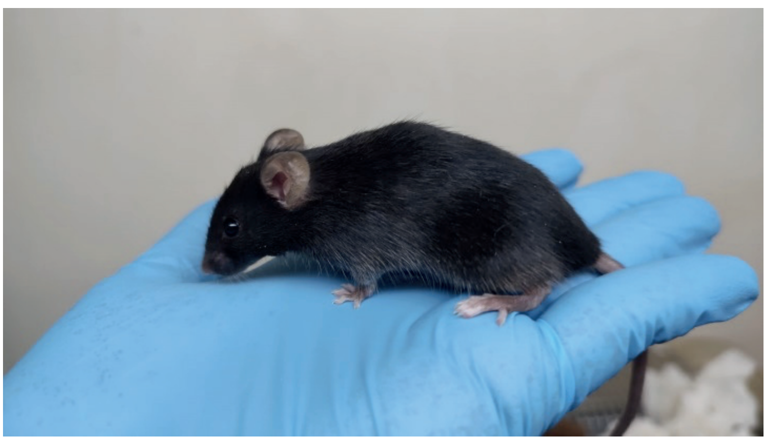


Figura 3: Camundongo com dorso levemente arqueado

Fonte: Yuli Maia, IOC/Fiocruz, 2022.

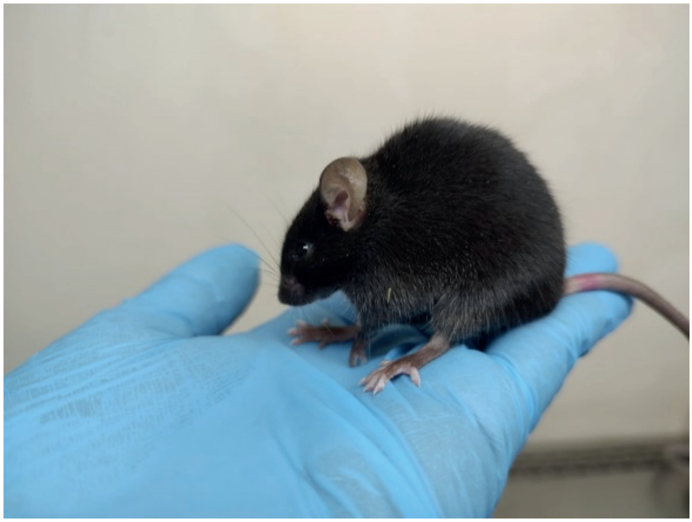


Figura 4: Camundongo com dorso gravemente arqueado

Fonte: Yuli Maia, IOC/Fiocruz, 2022.

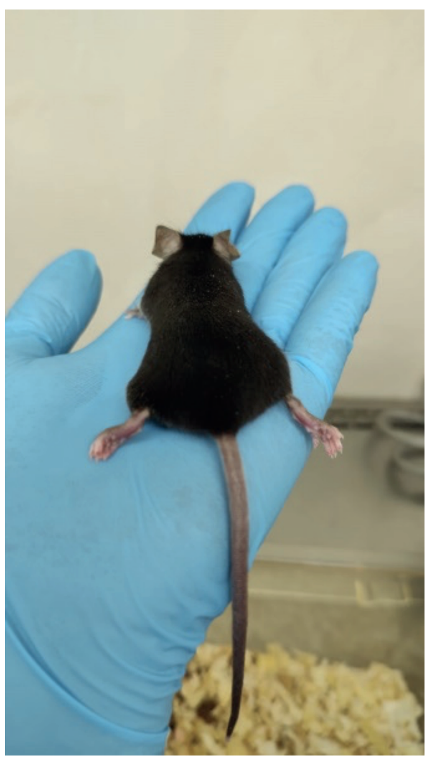


Figura 5: Camundongo com paralisia de membros posteriores

Fonte: Yuli Maia, IOC/Fiocruz, 2022.

REFERÊNCIAS

ALIOTA, Matthew T. *et al*. Characterization of lethal Zika virus infection in AG129 mice. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 4, p. e0004682, 2016.

ASHALL, V.; MILLAR, K. Endpoint matrix: a conceptual tool to promote consideration of the multiple dimensions of humane endpoints. **ALTEX - Alternatives to animal experimentation**, *[S. l.]*, v. 31, n. 2, p. 209–213, 2014.

ERICKSON, A. K.; PFEIFFER, J. K. Spectrum of disease outcomes in mice infected with YFV-17D. **The Journal of General Virology**, v. 96, n. Pt 6, p. 1339, 27 jan. 2015. Disponível em: </pmc/articles/PMC4635484/>. Acesso em: 8 jun. 2022.

GORMAN, M. J. *et al*. An immunocompetent mouse model of Zika virus infection. **Cell host & microbe**, v. 23, n. 5, p. 672, 5 maio 2018. Disponível em: </pmc/articles/PMC5953559/>. Acesso em: 9 ago. 2022.

JOHNSON, Katherine E. E. *et al*. Mapping the evolutionary landscape of Zika virus infection in immunocompromised mice. **Virus evolution**, v. 6, n. 2, p. 092, 2020.

KOCH, A. *et al*. Establishment of Early Endpoints in Mouse Total-Body Irradiation Model. **PLoS ONE 11**, e0161079 (2016).

MACIEL, M. *et al*. A DNA Vaccine against Yellow Fever Virus: Development and Evaluation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 4, 13 abr. 2015.

MEIER, K. C. *et al*. A Mouse Model for Studying Viscerotropic Disease Caused by Yellow Fever Virus Infection. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 10, p. e1000614, 9 out. 2009. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1000614>. Acesso em: 22 maio 2020.

MORRISON, T. E.; DIAMOND, M. S. Animal Models of Zika Virus Infection, Pathogenesis, and Immunity. **Journal of virology**, v. 91, n. 8, 15 abr. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28148798/>. Acesso em: 9 ago. 2022.

MORTON, David B. A systematic approach for establishing humane endpoints. **Ilar Journal**, v. 41, n. 2, p. 80-86, 2000.

NUNAMAKER, E. A.; ARTWOHL, J. E.; ANDERSON, R. J. & FORTMAN, J. D. Endpoint Refinement for Total Body Irradiation of C57BL/6 Mice. **Comparative Medicine** 63, 7 (2013).

OLIVEIRA, E. R. A. *et al*. Peripheral effects induced in BALB/c mice infected with DENV by the intracerebral route. **Virology**, 2016, 489: 95-107.

PAIXÃO, R. L. **Experimentação Animal:** razões e emoções para uma ética. Rio de Janeiro, 2001. 151 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2001.

WILSON, Heather L. *et al.* Neutralization assay for Zika and dengue viruses by use of real-time-PCR-based endpoint assessment. **Journal of clinical microbiology**, v. 55, n. 10, p. 3104-3112, 2017.

YAUCH, L. E.; SHRESTA, S. Mouse models of dengue virus infection and disease. **Antiviral research**, v. 80, n. 2, p. 87, nov. 2008. Disponível em: </pmc/articles/PMC3048811/>. Acesso em: 9 ago. 2022.

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS

Data de aceite: 03/07/2023

Isabele Barbieri dos Santos
Centro de Experimentação Animal, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz,
Rio de Janeiro/RJ
ORCID 0009-0002-6362-6329

1 | CONTEXTO GERAL

O principal objetivo da produção de anticorpos em animais de laboratório é a obtenção de antissoros com título elevado e elevada afinidade para utilização em testes experimentais ou de diagnóstico (UNIÃO EUROPEIA, 2010).

Muito da biologia e da bioquímica moderna dependem da disponibilidade de anticorpos altamente específicos para utilização em diversas técnicas, como a imuno-histoquímica, os testes ELISA, a imunoprecipitação e a imunotransferência. Assim, a geração de grandes quantidades de anticorpos específicos dirigidos a proteínas ou peptídeos de interesse é essencial para o êxito de muitos programas de investigação básica e aplicada (UNIÃO EUROPEIA, 2010).

Os anticorpos são produzidos pelo sistema imunológico de um animal numa resposta específica a um desafio por um imunógeno. Os imunógenos (antígenos) são moléculas que podem induzir uma resposta imune e geralmente são proteínas ou carboidratos ou, às vezes, lipídios e ácidos nucleicos. O sistema imune de mamíferos é composto de muitos linfócitos, cada um caracterizado por seu único receptor de antígeno específico. Essa diversidade de receptores é responsável por respostas imunes a uma ampla gama de imunógenos. Os linfócitos B, caracterizados pela presença de receptores específicos de imunoglobulinas em sua superfície, são responsáveis pela produção da resposta humoral (anticorpo). Os anticorpos são secretados a partir de células plasmáticas que se diferenciaram dos linfócitos B após estimulação pelo imunógeno estranho. Cada molécula de anticorpo é capaz de reconhecer um epítopo específico (antigênico local), geralmente 5-6 aminoácidos ou unidades

monossacarídicas que são lineares ou montadas topograficamente, e é capaz de ligação a esse epítopo. Uma resposta humoral policlonal é composta de anticorpos, derivados de vários clones, populações com especificidades variadas (por diferentes epítopos, mesmo na mesma molécula), afinidades e classes e, portanto, oferece uma defesa eficaz contra patógenos. Os antissoros policlonais (pAcps) são difíceis de reproduzir devido à variedade de anticorpos produzidos na resposta policlonal. O nível e a qualidade dos anticorpos produzidos variam de animal para animal e de um único animal ao longo do tempo. Portanto, os pAcps têm uma disponibilidade finita e estão sujeitos a possível mudança de caráter durante o período de produção. Por outro lado, anticorpos monoclonais (mAcps) são derivados de um único clone e, portanto, são específicos para um único epítopo e têm uma definição/afinidade por esse epítopo. Assim, se o mAcp é obtido, pode ser extremamente específico para o imunógeno relevante, e, sob condições adequadas, uma ilimitada produção de um produto constante é possível (CCAC, 2002).

Os antissoros policlonais podem ser obtidos em período relativamente curto (1-2 meses), em contraste com a produção de mAcp padrão, em que os procedimentos podem ser tediosos e exigir 3-6 meses. Anticorpos policlonais mostram diferentes afinidades para diferentes epítopos e, portanto, podem demonstrar excelente encadernação alcançada pela adesão a vários sítios diferentes em um complexo imunógeno ou antígeno. Em contraste, a especificidade de epítopo único de mAcps pode significar que uma ligeira mudança na estrutura do epítopo, por exemplo, por desnaturação de antígeno (como ocorre em experimentos de *immunoblotting* ou por esterilização do imunógeno antes da injeção no animal), pode resultar na perda de anticorpos vinculativos, e, por essa razão, dois ou três mAcps são combinados (CCAC, 2002).

2 | ANTICORPOS POLICLONAIS

Os anticorpos policlonais (pAcps; antissoros) têm uma série de usos em pesquisa, por exemplo: para detecção de moléculas em tipo ELISA ensaios; em Western blots; em imunohistoquímica e imunoprecipitação; imunofluorescência e microscopia imunoeletrônica. Os antissoros são comumente produzidos por injeção do imunógeno de interesse em um animal, muitas vezes em combinação com um adjuvante para aumentar a resposta imune. A resposta de anticorpos pode ser aumentada por injeções de reforço subsequentes do antígeno com ou sem adjuvante. É importante salientar que as emulsões de Freund completo e incompleto não são mais permitidas para obtenção de antissoros policlonais, pois a sua composição à base de lanolina e parafina, bem como na chamada formulação completa, é acrescida de células de *Micobacterium bovis* inativado pelo calor.

Todas essas substâncias são extremamente inflamatórias e causam reações doloridas, levando à dor e desconforto ao animal. Pode-se usar emulsões com base de óleos brancos de qualidade farmacêutica (ex: Marcol® - Exxon) e substâncias surfactantes

de aplicação farmacêutica (Span 80®, tween 80®), ou, ainda, óleos biodegradáveis, como o esqualeno (BRASIL, 2022).

As amostras de sangue são obtidas do animal para avaliar o nível de anticorpos produzidos e, uma vez que o título suficientemente alto foi alcançado, o antissoro é preparado por coleta de sangue seguido pela preparação do soro, com posterior purificação dos anticorpos do soro, se necessário. Conhecimento básico dos mecanismos envolvidos na geração de uma imunidade humoral resposta é essencial para o desenvolvimento de protocolos apropriados para partículas imunógenos ou antígenos (HANLY *et al*., 1995).

3 | ANTICORPOS MONOCLONAIS

Os anticorpos monoclonais podem ter excelentes especificidades e podem ser aplicados para quase qualquer finalidade. A escolha da espécie animal a ser utilizada para a imunização é baseada, em parte, na capacidade de gerar anticorpos de grande especificidade para antígenos geneticamente definidos, que podem necessitar de uma produção em larga escala com desejável reatividade cruzada. A quantidade de anticorpo necessária também deve ser avaliada. Os clones de hibridomas, híbridos de células B de baço e de mieloma de tumores de um animal imunizado, são permissivos para a produção de imunoglobulinas monoclonais, fornecem uma quantidade bastante limitada e essencialmente têm reatividade para apenas um epítopo. No entanto, o investimento inicial na produção de um anticorpo monoclonal é grande, ao passo que quantidades relativamente abundantes de um antissoro policlonal podem ser obtidas a partir de um único coelho ou a partir de vários camundongos ou ratos geneticamente idênticos ou, ainda, cavalos (BRASIL, 2022).

Embora os avanços oferecidos pelo desenvolvimento de técnicas de anticorpos monoclonais tenham revolucionado a especificidade, a uniformidade e a quantidade de anticorpos, existem muitas circunstâncias em que os anticorpos policlonais são mais desejáveis do que os monoclonais. A produção de antissoros policlonais leva menos tempo e esforço do que a produção de anticorpos monoclonais, exige um equipamento relativamente simples e prontamente disponível e produz reagentes que podem ser utilizados para imunoprecipitação, imunotransferência e imunoenzimático.

4 | MODELOS ANIMAIS PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS

4.1 Seleção e Cuidados de Animais

Na produção de anticorpos policlonais e monoclonais, é obrigatório minimizar a dor e sofrimento dos animais utilizados. Uma consideração cuidadosa deve ser dada à seleção das espécies para serem usadas para produção anticorpo policlonal. Deve-se considerar cuidadosamente a adequação da espécie e estirpe escolhida. O investigador deve considerar

os seguintes fatores: 1) a quantidade de Acp ou antissoro necessária (animais maiores devem ser considerados quando maiores quantidades de Acp são requeridas); 2) a relação filogenética entre as espécies das quais o antígeno proteico é originado e a espécie usada para elevar o Acp; 3) a função efetora dos pAcps feitos pelas espécies que aumentam Acp (como a capacidade de fixação do complemento); e 4) o uso pretendido dos anticorpos (por exemplo, em um ELISA, o anticorpo que se liga ao antígeno precisa ser derivado de uma espécie diferente do anticorpo secundário usado na próxima etapa do ensaio). Diferentes linhagens de espécies também podem reagir de forma diferente, devido à variação genética na apresentação do antígeno no complexo principal de histocompatibilidade das moléculas e nos mecanismos reguladores da resposta imune.

A escolha do animal para a produção de anticorpos depende da quantidade desejada de antissoro, da distância evolutiva entre as espécies, de qual proteína de interesse foi derivada, da espécie do animal a ser imunizado e experiência prévia com os imunógenos. Os coelhos são os animais de escolha, porque eles são geneticamente distintos das fontes de proteínas humanas e de camundongos, os quais possuem as proteínas mais estudadas. Coelhos podem fornecer até 50 ml de soro, sem efeitos prejudiciais significativos aos animais.

É importante usar coelhos livres de doenças para todos os procedimentos imunológicos para reduzir a probabilidade de *Pasteurella multocida*, abscessos nos locais de injeção e para minimizar a probabilidade de reatividade cruzada com outros antígenos que o sistema imunológico dos coelhos pode ter encontrado anteriormente.

Quando for utilizada pequena quantidade de antissoro ou para aqueles que dependem de anticorpos com especificidades precisamente definidas, linhagens puras de animais, camundongos, por exemplo, podem ser o sistema de escolha. Porém, os camundongos são menores, o volume de suspensão de antígeno utilizado para a imunização é significativamente menor e a quantidade de soro que pode ser obtida a partir de uma única punção não é superior a 0,5 ml.

Os ratos e hamsters podem ser usados quando são necessárias quantidades de soro maiores ou quando a maior distância evolutiva é vantajosa. Com punção repetida, pode-se obter até 5 ml de soro a partir dessas espécies. Na presença de adjuvante (emulsões ou hidróxido de alumínio), o antígeno à base de proteína é aplicado por via intramuscular, intradérmica, subcutânea, conforme protocolo sob supervisão de médico veterinário, na espécie escolhida de animal. Imunizações de reforço são iniciadas 4 a 8 semanas após a imunização primária e continua em intervalos de 2 a 3 semanas. Antes da primeira imunização e de cada imunização de reforço, obtém-se o sangue do animal e o soro final é preparado a partir de sangue total.

O coelho é o animal mais comumente empregado na produção de pAbs, pois é de fácil manejo e coleta de sangue, e para a maioria das aplicações produzirão um volume de alto título, alta afinidade, antissoro (STILLS, 1994). Um sangramento típico de um coelho

deve render aproximadamente 250mg de pAcps; um sangramento terminal pode render aproximadamente 1 g de pAcps.

A galinha está filogeneticamente distante de mamíferos e, portanto, pode ser útil para aumentar pAcps para proteínas de mamíferos e, em particular, para proteínas intracelulares, vez que a sequência de aminoácidos de muitas proteínas intracelulares tende a ser conservada entre as espécies de mamíferos. O produto IgY é, para quase todos os fins, equivalente à classe de IgG de mamífero. A galinha pode ser considerada refinamento da técnica, pois pAcps podem ser extraídos da gema do ovo, retirando a necessidade de coleta de sangue. O uso do frango também pode representar uma redução em uso animal, pois as galinhas produzem quantidades maiores de anticorpos do que roedores de laboratório (SVENDSEN BOLLEN *et al*., 1995; SCHADE *et al*., 1996).

Normalmente, um único ovo conterá até a 250 mg de pAb na gema (ERHARD *et al*., 2000). Em geral, as galinhas são potentes produtoras de anticorpos e seus efeitos imunológicos e a capacidade de resposta são semelhante aos dos mamíferos. No entanto, é importante enfatizar que o frango não é adequado para todas as aplicações, e instalações apropriadas para alojar galinhas devem estar disponíveis se elas forem usadas.

Em geral, os roedores são usados com menos frequência do que coelhos para a produção de pAcps, mas podem ser adequados quando pequenos volumes de pAcps são requeridos. Volumes de sangue que podem ser coletados desses animais são consideravelmente menores e, portanto, a coleta de um volume razoável pode exigir punção sob anestesia terminal. O rato pode ser usado quando Acps de restrição a especificidade para proteínas de rato são necessários, ou para a produção de IgE (GARVEY *et al*., 1977). O hamster é usado para produzir proteína de Acps quando tais pAcps não podem ser prontamente produzidos no rato ou quando uma maior especificidade de pAcps é necessária. Historicamente, a cobaia era comumente usada para a produção de anticorpos, em particular para uso em ensaios de insulina, mas, de outra forma, não parece ter qualquer significado vantajoso sobre o uso de roedores.

Espécies maiores são usadas quando grandes volumes de antissoros são necessários, em particular para a produção comercial. Cavalos, ovinos e caprinos, por exemplo, têm uma longa vida útil, são relativamente fáceis de manusear e podem ser sangrados da veia jugular. A exigência para grandes instalações e a despesa de manter animais maiores limitaram seu uso, principalmente para a produção comercial de antissoros. Importante ressaltar que os cavalos, que têm sido utilizados para produzir antissoros para toxinas e venenos para aplicações clínicas, são particularmente intolerantes a adjuvantes à base de óleo, como Adjuvante Completo de Freund (FCA) e saponina (Quil A). Os anticorpos também podem ser colhidos do leite de gado, ovelha e cabras e representam um meio não invasivo de adquirir repetidamente grandes volumes de pAcps.

Quando as considerações específicas da espécie não são um problema, a espécie deve ser escolhida de forma a minimizar a dor e a angústia, tendo em mente a facilidade

de manuseio para injeção e coleta de amostra de sangue. O requisito esperado do pAcps influenciará o volume de soro necessário e isso afetará a espécie animal e número de animais utilizados. Em geral, os animais adultos jovens são melhores produtores de pAb do que animais mais velhos, pois a função imunológica atinge o pico na puberdade e, em seguida, lentamente declina. Além disso, as fêmeas são preferidas, pois muitas vezes produzem uma forte resposta imune e tendem a ser mais dóceis, de manuseio mais fácil e convivem mais facilmente em grupo (com exceção das fêmeas de hamster). Para maiores espécies de animais de fazenda, machos castrados também podem ser adequados.

Grossman (1989) documentou a produção aumentada de pAcps por adultos fêmeas. Outros fatores que influenciam produção de pAcp incluem: a natureza do imunógeno para ser usado; a via e tempo de administração; o tipo e a qualidade do adjuvante; a natureza da formulação de imunógeno/adjuvante (ou seja, emulsão, formação de lipossomas, formação ou adsorção de complexo imunoestimulatório); o método de coleta de sangue; a tensão, saúde e genética dos animais; a formação, perícia e competência da equipe de cuidados com os animais; e a dieta e habitação. Além disso, deve-se notar que a presença de agentes infecciosos e/ou estresse pode suprimir a resposta imune e, assim, reduzir a quantidades de pAcps produzidas, ou mesmo resultar em nenhuma resposta significativa.

O estado de pré-imunização dos animais, em relação ao imunógeno ou a outros antígenos de reação cruzada a serem administrados, deve ser determinado. Imunógenos específicos Acps pré-existentes podem influenciar tanto a qualidade quanto a quantidade de Acps, especialmente quando é necessário um pAcp monoespecífico. Geralmente uma pré-imunização (pré-sangramento) com amostra de soro é preparada em quantidade suficiente para ser usada como controle ao longo de todo o teste. Os animais devem ser alojados em condições que melhor atendam às suas necessidades sociais e comportamentais para permitir o comportamento natural, com grupos sendo a habitação preferida. Pesquisadores e sua equipe de apoio devem ter formação adequada e competência para manusear os animais envolvidos na produção de anticorpos. O treinamento e a competência dos pesquisadores e sua equipe com os animais são de grande importância na minimização da dor e/ou sofrimento para os animais. Além de ter conhecimento de bem-estar e manuseio dos animais, a equipe deve entender sobre princípios lógicos de imunologia básica e ser treinada e competente em procedimentos de imunização e na coleta de sangue. Para algumas espécies, isso exigirá conhecimento de procedimentos de anestesia e analgesia. A equipe também deve ser capaz de reconhecer a dor e/ou angústia nas espécies utilizadas (CCAC, 2002; ACLAM, 2006; BRASIL, 2022).

4.2 Parâmetros para avaliação clínica e comportamental

Espera-se apenas ligeira gravidade, graças aos refinamentos nos procedimentos zootécnicos e nos cuidados, às boas práticas de administração e amostragem e à escolha

de um adjuvante minimamente irritante.

O potencial para utilizar adjuvantes minimamente irritantes e agentes anestésicos menos aversivos deveria ser revisto regularmente através de acompanhamento da literatura e de discussão com os colegas. Poderia ser criado um programa de habituação de coelhos jovens ao manuseamento para reduzir ainda mais o estresse (ROWAN, 1992; BRASIL, 2022).

4.3 Avaliação prospetiva inicial e consideração dos refinamentos e limites críticos humanos específicos

O que este estudo implica que se faça aos animais?	**O que sentirão os animais? Que grau de sofrimento poderá causar? O que o poderá agravar?**	**De que forma será possível reduzir ao mínimo o sofrimento?**	
	Efeitos adversos	Metodologia e intervenções	Limites críticos
Imunização com antígeno e adjuvante.	Desconforto após a injeção. Podem se desenvolver nódulos não dolorosos em resposta ao adjuvante. Possível (rara) ulceração no local da injeção.	O volume, a formulação e a frequência da injeção serão determinados em conformidade com as orientações de boas práticas (por exemplo, diretiva EU 2013, RN55 CONCEA), normalmente um máximo de quatro locais e 0,25 ml por local.	O animal será submetido a eutanásia sem dor se surgirem sinais de desconforto, dor ou angústia (por exemplo, atenção persistente aos locais de injeção ou nódulos) ou caso se formem úlceras.
Recolha de amostras de sangue para avaliar a resposta dos anticorpos.	Captura, manuseamento e contenção, que podem ser desgastantes. Ligeiro desconforto associado à picada da agulha. Baixo risco de hemorragia ou formação de hematoma.	A amostra será de uma veia superficial: Coelhos – orelha; hamsters – plexo gengival; ratos – cauda; camundongos – submandibular. Pequenos volumes de sangue: coelhos -2-5 ml; hamsters e ratos 0,5 ml; camundongos 20-50 microlitros. Apenas para verificar os títulos de anticorpos. Aplicar pressão no local da coleta da amostra.	Se o animal evidenciar estresse exagerado devido ao procedimento, a coleta da amostra será adiada para quando o comportamento do animal regressar ao normal.
Sangria sob anestesia geral e analgesia.	Ligeiro desconforto e possível aversão ao agente durante a indução da anestesia.	Agente anestésico e analgésico minimamente aversivo utilizado.	O animal continuará sob anestesia até vir a óbito.

4.4 Formulário para observação e monitoramento dos principais parâmetros

O êxito de um modelo de formulário para observação clínica/observacional depende

da seleção de indicadores de bem-estar que: sejam pronta e facilmente reconhecíveis; eficazes na realização de boas mensurações do bem-estar; práticos de realizar, que não perturbem excessivamente o animal e permitam uma fácil mensuração, interpretação e análise consistentes.

Uma abordagem comum para registar observações clínicas é necessária, pois ajuda a desenvolver abordagens consistentes de classificação da severidade. Dessa forma, facilita-se a realização de comparações de sinais clínicos entre estudos e informam-se os envolvidos na avaliação da severidade do estudo.

As observações devem ser estruturadas nas seguintes categorias de alto nível: Aspeto/ Funções fisiológicas/ Meio ambiente/ Comportamentos/ Indicadores específicos do procedimento e Observações livres.

5 | PONTO FINAL HUMANITÁRIO EM MODELOS PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS

5.1 Exemplo de ficha de pontuação para coelhos submetidos à produção de anticorpos policlonais

a. Ficha 1: Escore clínico-comportamental

ESCORE CLÍNICO-COMPORTAMENTAL	
ASPECTO	**PONTUAÇÃO**
PESO CORPORAL	
5-10% de perda de peso	1
11-15% de perda de peso	2
16-20% de perda de peso	3
20% + de perda de peso	E
POSTURA	
Desloca-se lentamente	1
Fica deitado com abdômen em contato com o piso na maior parte do tempo	2
Não se desloca durante a maior parte do tempo	E
ALTERAÇÃO DE TEMPERATURA CORPORAL **Faixa normal: 36,5ºC (35ºC -37,9ºC)**	
Até 2ºC acima da faixa normal	1
Até 3ºC acima da faixa normal	2
> 3º da faixa normal	E
Hipotermia < 35ºC	E
ATIVIDADE	
Pouco se movimenta, altera postura, apresenta movimentos de cabeça e pescoço e não exerce atividade normal	2
Está imóvel e não exerce atividade normal	E

APETITE	
Diminuição moderada de ingestão	1
Diminuição moderada de ingestão	1
Diminuição da defecação	1
Ausência de ingestão	E
Ausência de defecação	E
INTERAÇÃO	
Ausência de interação com objetos de enriquecimento ambiental	1
Ausência de curiosidade	1
Ausência de farejamento	1
Ausência de comportamento de autolimpeza	1
EXPRESSÃO FACIAL	
Apresenta olhos semicerrados	1
Apresenta olhos fechados	E
Apresenta orelhas fletidas em algum momento	3
Apresenta orelhas fletidas a maior parte do tempo	E
COMPORTAMENTO	
Faz menção de se levantar, porém permanece deitado	2
Retrai-se e fecha os olhos	2
Apresenta tremores com maior frequência na cabeça e orelhas	2
ATENÇÃO À ÁREA DE INOCULAÇÃO	
Lambe a área afetada	1
Pressiona o local da inoculação contra o piso ou gaiola	2
Mantém o membro suspenso (caso a inoculação seja no membro)	3
LESÕES NA ÁREA DE INOCULAÇÃO	
Úlcera	3
Abscesso	E
Tomar as seguintes ações de acordo com a pontuação total de escores obtidos na tabela acima	PONTUAÇÃO
Aumentar a frequência do monitoramento dos animais para 2 vezes ao dia	4
Implementar, se possível, intervenção clínica de cuidados veterinários	5 – 7
Eutanásia	8
Eutanásia - Quaisquer desses parâmetros sozinhos indicam grandes alterações fisiológicas com indicativo de dor e distresse ao animal, levando a intenso sofrimento.	E

b Ficha 2 - Acompanhamento diário

FICHA DE ACOMPANHAMENTO DIÁRIO				
Nº DO ANIMAL: **DATA:**	**Dia 1**	**Dia 2**	**Dia 3**	**Dia 4**
ASPECTO				
Peso corporal				
Postura				
Alteração da temperatura corporal				
Atividade				
Apetite				
Interação				
Expressão facial				
Comportamento				
Atenção à área de Inoculação				
Lesões na área de inoculação				
PONTUAÇÃO TOTAL				
Outras observações				

5.2 Exemplo de ficha de pontuação para camundongos submetidos a produção de anticorpos policlonais

a. Ficha 1: Escore clínico-comportamental

ESCORE CLÍNICO-COMPORTAMENTAL	
ASPECTO	**PONTUAÇÃO**
PESO CORPORAL	
5-10% de perda de peso	1
11-15% de perda de peso	2
16-20% de perda de peso	3
20% + de perda de peso	E
ESTADO DO PELO	
Ligeira piloereção	1
Piloereção moderada	2
Piloereção intensa	3
ALTERAÇÃO DE TEMPERATURA CORPORAL **Faixa normal: 36,5ºC (35ºC -37,9ºC)**	
Até 2ºC acima da faixa normal	1
Até 3ºC acima da faixa normal	2
> 3º da faixa normal	E
Hipotermia < 35ºC	E

EXPRESSÃO FACIAL	
Redução da órbita ocular até 50% com ou sem secreção	2
Surgimento de rugas entre a narina e a comissura medial do olho do mesmo lado	3
Rotação das orelhas para fora ou para trás, aumentando o espaço entre elas	3
Quando o formato do globo ocular passar de redondo a elíptico com surgimento de ruga ao redor dos olhos e redução de 50% da área ocular ou mais com ou sem secreção	E
ALTERAÇÃO COMPORTAMENTAL	
Parar de correr	1
Estacionário sem ser provocado	2
Estacionário mesmo provocado	E
ATENÇÃO À ÁREA DE INOCULAÇÃO	
Lambe a área afetada	1
Pressiona o local da inoculação contra o piso ou gaiola	2
Mantém o membro suspenso (caso a inoculação seja no membro)	3
LESÕES NA ÁREA DE INOCULAÇÃO	
Úlcera	3
Abscesso	E
Tomar as seguintes ações de acordo com a pontuação total de escores obtidos na tabela acima	**PONTUAÇÃO**
Aumentar a frequência do monitoramento dos animais para 2 vezes ao dia	4
Implementar, se possível, intervenção clínica de cuidados veterinários	5 – 7
Eutanásia	8
Eutanásia - Quaisquer desses parâmetros sozinhos indicam grandes alterações fisiológicas com indicativo de dor e distresse ao animal, levando a intenso sofrimento.	E

b. Ficha 2 - Acompanhamento diário

FICHA DE ACOMPANHAMENTO DIÁRIO				
Nº DO ANIMAL: **DATA:**	**Dia 1**	**Dia 2**	**Dia 3**	**Dia 4**
ASPECTO				
Peso corporal				
Estado do pelo				
Alteração da temperatura corporal				
Expressão facial				
Alteração comportamental				
Atenção à área de inoculação				
Lesões na área de inoculação				
PONTUAÇÃO TOTAL				
Outras observações				

REFERÊNCIAS

ACLAM Task Force Members; KOHN, D. F.; MARTIN, T. E.; FOLEY, P. L.; MORRIS, T. H.; SWINDLE, M. M.; VOGLER, G. A.; WIXSON, S. K. Public statement: guidelines for the assessment and management of pain in rodents and rabbits. **J Am Assoc Lab Anim Sci**. 2007 Mar;46(2):97-108.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). **Resolução nº 55, de 5 de outubro de 2022**. Atualiza o texto da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica - DBCA. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações, 07 out. 2022. Disponível em: https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea/arquivos/arquivo/legislacao/resolucao-normativa-no-55-de-5-de-outubro-de-2022.pdf. Acesso em: 11 dez. 2022.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE, 2002. **Guidelines on**: antibody production. Disponível em: http://www.ccac.ca.

ERHARD, M. H.; MAHN, K.; SCHMIDT, P.; OLTMER, S.; PREISINGER, R.; ZINSMEISTER, P.; STANGASSINGER, M. Evaluation of various immunization procedures in laying hens to induce high amounts of specific egg yolk antibodies. **Alternatives to Laboratory Animals** 28:63-80, 2000.

GARVEY, J. S.; CREMER, N. E. & SUSSDORF, D. H. **Methods in Immunology**, 3rd Edn. Reading MA: W.A. Benjamin, Inc, 1977.

GROSSMAN, C. J. Possible underlying mechanisms of sexual dimorphism in the immune response, fact and hypothesis. **Journal of Steroid Biochemistry** 34:241-251, 1989.

HANLY, W. C.; ARTWOHL, J. E. & BENNETT, B. T. Review of polyclonal antibody production procedures in mammals and poultry. **Institute for Laboratory Animal Research Journal** 37:93-118, 1995.

ROWAN, A. The Principles of Humane Experimental Technique W M S Russell and R L Burch (1992[1959]). **Universities Federation for Animal Welfare:** Potters Bar. 238 pp. UK. Animal Welfare, 1(4), 304-305. ISBN 0 900767 78 2. 1992. doi:10.1017/S0962728600015335.

SCHADE, R.; STAAK, C.; HENDRIKSEN, C.; EHARD, M.; HUGL, H.; KOCH, G.; LARSSON, A.; POLLMANN, W.; REGENMORTEL, V.; PIJKE, E.; SPIELMANN, H.; STRAUGHAN, D. The production of avian (egg yolk) antibodies-IgY: The report and recommendations of ECVAM Workshop 21. **Alternatives to Laboratory Animals** 24(6): 925-934, 1996.

STILLS, H. F. Polyclonal Antibody Production. *In*: **The Biology of the Laboratory Rabbit**, 2nd Edn. (eds. P.J. Manning, D.H. Ringler & C.E. Newcomer). San Diego CA: Academic Press. 1994, p. 435-448.

SVENDSEN BOLLEN, L.; CROWLEY, A.; STODULSKI, G.; HAU, J. Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG. A comparison of titre and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. **J Immunol Methods**. 1996 May 27;191(2):113-20. doi: 10.1016/0022-1759(96)00010-5.

UNIÃO EUROPEIA. Diretiva 2010/63/UE on the protection of animals used for scientific purposes. Working document on a severity assessment framework. **Brussels**, 11-12 July 2012. Disponível em: https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/guidance/severity/en.pdf

CAPÍTULO 9

CIRURGIAS EXPERIMENTAIS E PONTO FINAL HUMANITÁRIO EM BIOMODELOS ANIMAIS

Data de aceite: 03/07/2023

Wesley Lyeverton Correia Ribeiro
Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará
ORCID 0000-0002-2784-0013

Cayo Antônio Soares de Almeida
Universidade Federal do ABC, Santo André, São Paulo
ORCID 0000-0003-4562-192X

Augusto César Aragão Oliveira
Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará
ORCID 0000-0003-0253-1545

1 | INTRODUÇÃO

O uso de animais para as mais diversas necessidades humanas foi fomentado, ao longo da história, por reflexões éticas, filosóficas e religiosas. Conceitos construídos nos últimos séculos foram substanciais para o aprofundamento da discussão sobre a relação homem-animal, sobretudo no que diz respeito ao uso de biomodelos pela ciência.

O uso de animais para fins científicos é uma prática de longa data na pesquisa biológica e na Medicina e é um assunto de frequentes debates na sociedade (BARRE-SINOUSSI, MONTAGUTELLI, 2015). Nessa perspectiva, experimentos científicos utilizando animais contribuíram significativamente para o desenvolvimento de vacinas, antibióticos e para a compreensão dos processos que envolvem as doenças humanas. Assim, modelos animais são úteis para o conhecimento sobre ação de medicamentos e efeitos de intervenções cirúrgicas nos organismos (FERREIRA, HOCHMAN, BARBOSA, 2005; SINGH, SEED, 2021).

No campo da cirurgia experimental, os animais foram fundamentais no desenvolvimento de diversos protocolos. Esses biomodelos foram usados, por exemplo, na obtenção de novas técnicas cirúrgicas como a traqueostomia, inicialmente realizada por Ibn Zuhr, em cabras, no século XII (ABDEL-HALIM, 2005), e a laparoscopia, originada do trabalho de Georg Kellings com cães no século XX (SCHOLLMEYER *et al.*, 2007). Na década de 1940, Vivien Thomas e

Alfred Blalock desenvolveram um modelo canino que mimetizava a tetralogia de Fallot (TOF), permitindo o desenvolvimento de técnicas cirúrgicas para repará-la, sendo este o tratamento de escolha até hoje (HINES, 2019).

Além de serem historicamente importantes para o desenvolvimento de inúmeras técnicas cirúrgicas, biomodelos vivos e cadáveres de animais têm sido utilizados como meio de ensinar e melhorar a habilidade cirúrgica de profissionais (LOH *et al.*, 2018). Embora existam modelos que se propõem a substituir o uso de animais nessas práticas, como o uso de simuladores de realidade virtual, a utilização de animais vivos ainda é o padrão-ouro na formação técnica em microcirurgias, na medida em que dá aos profissionais em formação uma experiência realista e aumenta a sua preparação para o ambiente clínico, pois oferece fisiologia semelhante à real prática em humanos, no que diz respeito, por exemplo, ao fluxo sanguíneo, perfusão, trombose e manipulação de outras estruturas circundantes, como ossos e músculos (JAVID *et al.*, 2019).

Dentre as espécies de animais, roedores das espécies *Rattus norvergicus* e *Mus musculus* são as mais amplamente utilizadas pela ciência atualmente (GRAF, CINELLI, ARRAS, 2016). As justificativas para uso desses biomodelos incluem o fácil manejo, quando comparado àqueles de maior porte; homologia anatômica, fisiológica e genética (BARRE-SINOUSSI, MONTAGUTELLI 2015). Na execução dos diversos testes experimentais relacionados às doenças, protocolos cirúrgicos podem ser necessários em muitos casos, seja para indução de um modelo de interesse ou para coleta de tecidos a serem analisados (GRAF, CINELLI, ARRAS, 2016).

O treinamento técnico do profissional deve preceder qualquer procedimento cirúrgico, mesmo os mais simples (PRITCHETT-CORNING *et al.*, 2011; MIWA, SLADKY, 2016). A capacitação técnica é necessária para garantir a qualidade dos testes e o adequado manejo da dor ou sofrimento nos animais, caso ocorram. Assim, diversas resoluções normativas, diretrizes e leis que regulamentam protocolos experimentais em todo o mundo exigem treinamentos prévios e aquisição de habilidades para assegurar o bem-estar animal (GRAF, CINELLI, ARRAS, 2016; BARRE-SINOUSSI, MONTAGUTELLI, 2015).

Na condução de protocolos cirúrgicos, o pesquisador deve não somente conhecer a anatomia e comportamento natural da espécie utilizada, mas receber treinamento em assepsia, adquirir habilidade para manuseio e dissecação de tecidos e órgãos, além de fazer uso adequado de instrumentos e ser capaz de identificar condições clínicas apresentadas pelo animal no pré, trans e pós-operatório (PRITCHETT-CORNING *et al.*, 2011; MIWA, SLADKY, 2016). Essas habilidades são essenciais para definir a melhor conduta a ser adotada, desde a preparação do animal até seu completo restabelecimento. Destaca-se, ainda, que o pesquisador deve ser capaz de avaliar as condições de bem-estar animal durante todo o procedimento e, caso seja necessário, colocar em prática o ponto final humanitário, diante de intercorrências cirúrgicas irreversíveis, como será discutido mais adiante.

2 | PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO CLÍNICA DE ROEDORES SUBMETIDOS A PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Inicialmente, cabe-nos sublinhar que todo procedimento cirúrgico deve ser precedido de ampla consulta à literatura, visando ao emprego de técnicas minimamente invasivas e refinadas, as quais, normalmente, requerem menos anestesia, analgesia e produzem menos complicações pós-operatórias. Além disso, procedimentos refinados podem ser tecnicamente mais fáceis de serem executados e estão em consonância com as diretrizes dos 3Rs.

Essencialmente, a avaliação dos parâmetros clínicos em biomodelos submetidos a procedimentos cirúrgicos deve acontecer durante três momentos: períodos pré-operatório, transoperatório e pós-operatório. Em todas essas fases, é imprescindível que o bem-estar animal seja assegurado e que sejam utilizados todos os recursos possíveis na tentativa de evitar/minimizar a dor e o sofrimento.

2.1 Pré-operatório

No período pré-operatório, a realização de exames clínicos, incluindo observações comportamentais, antes da indução anestésica, é essencial. Por exemplo, a presença de secreções nos olhos ou nariz, emaranhados de pelos ou de sujeira na região perianal requerem investigação adicional. Se a aparência geral do animal for anormal ou algum dos sinais clínicos não estiver dentro da normalidade para a espécie, a indução da anestesia deve ser adiada até que o quadro seja revertido ou o animal seja retirado do estudo. Ademais, é útil monitorar a ingestão de alimento, água e peso corporal por alguns dias antes do procedimento, pois isso permitirá obtenção de parâmetros relevantes que podem ser comparados aos coletados no momento da recuperação do animal no pós-operatório (FLECKNELL, 2015).

Navarro *et al*. (2021) apresentam os principais parâmetros a serem avaliados no exame físico pré-anestésico e os achados que indicam um camundongo saudável ou com sinais clínicos de doenças (Quadro 1).

Parâmetro	Achados normais em camundongos saudáveis	Achados anormais, indicando doença sistêmica e mau estado físico
Aparência geral	Ativo, curioso, pelagem com aparência normal	Letárgico, curvado
Função respiratória	Respiração não perceptível, sem descarga nasal	Taquipneia, respirações abdominais profundas, respirações superficiais, respiração com boca aberta ou respiração ofegante
Membrana mucosa ou coloração da pele	Rósea	Pálida, azulada ou vermelho brilhante
Hidratação	Turgor de pele normal	Olhos afundados, piloereção, teste de turgor cutâneo tardio
Escore de condição corporal[2]	2,5 – 3	Obesidade: ECC de 5; magro e em mau estado, com pelve e coluna óssea: ECC<2

Quadro 1. Parâmetros a serem avaliados no exame físico de camundongos no pré-cirurgico[1].

[1]Adaptado de Navarro *et al.* (2021). [2]O Escore de Condição Corporal (ECC) varia de 1 a 5, sendo utilizado para avaliação da saúde do animal baseado em atributos físicos. Alterações no ECC podem se dar em decorrência do sexo, linhagem ou modelos de doenças nos animais. A descrição pormenorizada da escala relativa ao ECC para camundongos foi apresentada por Ullman-Culleré, Foltz (1999).

2.2 Transoperatório

Existe uma série de protocolos anestésicos e analgésicos que devem ser considerados conforme a espécie e o objetivo da cirurgia. No período transoperatório, é essencial que o animal seja mantido em plano anestésico adequado. Neste capítulo, nós nos deteremos apenas aos principais parâmetros de avaliação clínica dos roedores durante a realização de procedimentos cirúrgicos.

a. Resposta aos estímulos dolorosos

A resposta aos estímulos dolorosos é uma estratégia de avaliação essencial para se estimar a profundidade da anestesia. Em roedores, ao pinçamento da membrana interdigital, o reflexo de retração da pata deve ser avaliado. Se o membro for retraído, ou houver vocalização do animal, tais sinais são indícios de que o plano anestésico é inadequado para realização de procedimentos cirúrgicos.

b. Alteração nos reflexos oculares

A técnica de avaliação do reflexo palpebral e da posição do globo ocular é limitada para ratos e camundongos, pois, dependendo do protocolo utilizado, a perda desse reflexo pode ser observada em níveis anestésicos mais leves, como acontece com a anestesia com cloridrato de cetamina, por exemplo. Ademais, a posição do globo ocular e o grau de dilatação da pupila variam conforme a espécie e o anestésico utilizado, reforçando o fato de

não serem considerados como indicadores seguros de profundidade anestésica em ratos e camundongos (FLECKNELL, 2015).

c. Função cardiorrespiratória

A função respiratória deve ser avaliada antes da anestesia, para que alterações de padrão, profundidade e frequência respiratória (FR) possam ser comparadas após a indução anestésica. A frequência e o padrão respiratório devem ser cuidadosamente monitorados como indicadores da profundidade anestésica. Um padrão respiratório muito superficial pode indicar que o plano anestésico é muito profundo. Por outro lado, uma frequência respiratória muito elevada pode indicar que o animal está em um plano anestésico muito superficial e que, possivelmente, esteja sentindo dor (NAVARRO *et al.*, 2021).

Pequenas alterações na FR e na frequência cardíaca (FC) em roedores são indicadoras de alterações profundas e sinais precoces de complicações. É necessário que haja prevenção de hipercapnia, hipoxemia, bradicardia e hipotensão. Neste sentido, equipamentos simples, como estetoscópio e ultrassom Doppler, podem fornecer informações relevantes. O Doppler pode permitir o monitoramento audível da FR e RC. O eletrocardiograma (ECG) pode ser usado para avaliar possíveis alterações do ritmo e FC (BENNETT, LEWIS, 2022).

d. Perfusão tecidual e oxigenação

A perfusão sanguínea e a oxigenação podem ser monitoradas por meio da avaliação da cor da membrana mucosa, contudo, isso não é tão evidente em ratos e camundongos. Nessas espécies, deve-se considerar a cor geral da pele das orelhas, cauda e almofadas das patas. Em camundongos albinos com níveis normais de perfusão e oxigenação, essas áreas têm coloração rosada. Entretanto, podem ficar pálidas na ocorrência de vasoconstrição, hipotensão, hipovolemia ou hipóxia, ou ainda adquirir coloração rosa escura em casos de vasodilatação, hipercapnia ou alterações tóxicas (NAVARRO *et al.*, 2021).

A falta de alteração de coloração, no entanto, não indica que o animal esteja adequadamente oxigenado. Assim, a avaliação desses sinais deve sempre ser associada à verificação de outros indicadores fisiológicos.

e. Temperatura corporal

O hipotálamo regula a temperatura corporal por mecanismos de *feedback*, como vasodilatação, vasoconstrição, alterações na ventilação, respiração ofegante e calafrios (BENNETT, LEWIS, 2022). A hipotermia é uma das complicações mais comuns durante a anestesia. Camundongos, por exemplo, são particularmente sensíveis devido à alta relação área de superfície/massa (NAVARRO *et al.*, 2021).

A mensuração da temperatura corporal de roedores durante um procedimento cirúrgico é essencial. Vários instrumentos de aferição da temperatura podem ser utilizados, devendo-se dar prioridade à utilização de aparelhos eletrônicos que fornecem maior

acurácia. A região anal ou retal geralmente é o local de escolha para posicionamento da sonda para aferição de temperatura em ratos e camundongos (NAVARRO *et al*., 2021).

Destaca-se que equipamentos de aquecimento, como cobertores de ar forçado, cobertores de água aquecida circulante ou placas aquecedoras, devem estar próximos ao animal desde a sedação até a recuperação. Tal conduta diminui a perda de calor por radiação e convecção (SKORUPSKI *et al*., 2017).

Outros recursos podem ser utilizados no monitoramento dos parâmetros fisiológicos dos animais durante os procedimentos cirúrgicos, entretanto, requerem equipamentos específicos para sua realização, como a capnografia, aferição da pressão arterial sistêmica e da pressão venosa sistêmica.

2.3 Pós-operatório

Esta etapa é de extrema importância para o sucesso cirúrgico e a rápida recuperação do paciente. O retorno do animal da sedação/anestesia é altamente variável, dependendo do protocolo utilizado, da duração do procedimento e da condição do paciente (BENNETT, LEWIS, 2022).

Assim, após a cirurgia, o animal deve ser mantido em local aquecido, sem ruídos e com intensidade luminosa reduzida (STASIAK *et al*., 2003). Ademais, o piso e a parte inferior das paredes do recinto de recuperação devem ser acolchoados com toalhas ou cobertores, visto que os animais geralmente ficam instáveis quando começam a deambular (BENNETT, LEWIS, 2022).

Os sinais vitais devem ser monitorados a cada 10-15 minutos até que o animal esteja totalmente consciente e capaz de deambular. A hidratação com soluções salinas isotônicas e aquecidas (36–37°C) por via subcutânea ou intraperitoneal é recomendada durante a recuperação do animal, visando repor líquidos perdidos durante cirurgias, principalmente naquelas de longa duração (NAVARRO *et al*., 2021).

Visto que procedimentos cirúrgicos potencialmente causam dor e estresse nos modelos experimentais durante o pós-operatório, podendo comprometer seriamente o bem-estar animal, principalmente aqueles com maior grau de invasividade, a supressão desse desconforto é imperativa nesta etapa (STASIAK *et al*., 2003). Sinais clínicos de dor no pós-operatório devem ser monitorados sistematicamente para determinar a administração de analgésicos, cuja escolha deve ser feita de forma adequada, levando-se em consideração a espécie animal, o protocolo cirúrgico e o tempo de analgesia do fármaco.

A Escala de Grimace é um recurso particularmente útil na quantificação da dor no pós-operatório (MATSUMIYA *et al*., 2012). Outras condições clínicas dos animais podem ser utilizadas para verificar a ocorrência de dor em camundongos e ratos nesta fase, como discutiremos no tópico 4 deste capítulo.

3 | PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS EM ROEDORES

Serão apresentados aqui, de forma genérica, alguns procedimentos cirúrgicos utilizados, majoritariamente, em ratos e camundongos para fins científicos. Vale destacar que os protocolos podem sofrer variações entre os diversos grupos de pesquisa. Todavia, a discussão a seguir poderá servir de orientação para o estabelecimento de protocolo cirúrgico experimental seguro e adequado, ao propiciar o reconhecimento de intercorrências cirúrgicas e tomadas de decisões que evitarão o sofrimento ou a dor relacionada ao procedimento escolhido.

3.1 Cirurgias abdominais

Diversos modelos de doenças requerem cirurgias abdominais e, apesar de terem objetivos distintos, muitos protocolos apresentam características comuns, como a laparotomia, que configura acesso à cavidade abdominal, sendo uma cirurgia invasiva. Dependendo do objetivo e protocolo experimental, o pós-operatório poderá ser curto, compreendendo poucos dias, ou longo, podendo levar meses para a recuperação completa do animal.

Os principais procedimentos cirúrgicos abdominais incluem:

- Cirurgias renais (transplante renal, nefrectomia, ligação ou obstruções de vasos ou pedículos).

- Cirurgias hepáticas (hepatectomia, transplante hepático, ressecção parcial hepática [Figura 1], ligação de ducto biliar).

- Induções de estenoses no intestino.

- Procedimentos no timo e baço (timectomia e esplenectomia).

- Cirurgias no pâncreas (ligação do ducto pancreático e pancreatectomia).

- Cirurgias no sistema reprodutor (orquiectomia, ooforectomia, ovariohisterectomia e ovariosalpingohisterectomia).

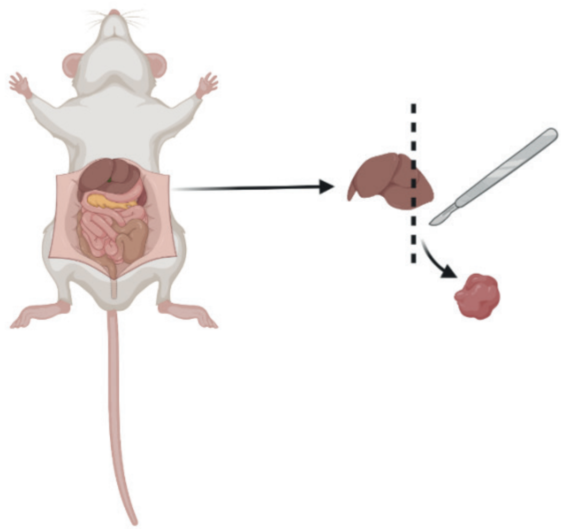


Fig.1: Disposição de órgãos abdominais em roedores após laparotomia e ressecção de fígado.

Fonte: Ribeiro, Almeida, Oliveira, 2023.

Na realização desses procedimentos, visando garantir um bom manejo da dor, é comum a adoção de protocolos analgésicos do tipo opioide antes da cirurgia. Um bom exemplo é o uso de buprenorfina (0.01 a 0.05 mg/kg) em ratos e camundongos, aplicado por via intraperitoneal entre 20 e 30 minutos antes do procedimento cirúrgico (GRAF, CINELLI, ARRAS 2016; TORELLI *et al.*, 2022). Nesta fase, outros fármacos também podem ser considerados para evitar efeitos adversos da anestesia ou para assegurar o plano anestésico adequado. Dentre eles, a acepromazina (2 mg/kg) é um bom exemplo de sedativo utilizado antes da indução anestésica em ratos e camundongos. Além disso, em muitos protocolos que promovem exposição de áreas com um alto nível de microrganismos, como o trato gastrointestinal, ou que induzam imunossupressão, pode ser indicado o uso de antibióticos no pré-operatório, como profilaxia. Entretanto, vale ressaltar que a antibioticoterapia não substitui procedimentos de assepsia (MIWA, SLADKY, 2016; GRAF, CINELLI, ARRAS, 2016).

Finalizados os procedimentos pré-operatórios, o protocolo cirúrgico pode ser iniciado a partir da indução anestésica. A vaporização de anestésicos (Figura 2) para inalação é comumente utilizada em ratos e camundongos, como é o caso do isoflurano, que pode ser utilizado em concentrações entre 4 e 5% para indução e de 1 a 2% para manutenção do plano anestésico, em associação com oxigênio medicinal *(ZHANG et al.*, 2019; ASHBY *et al.*, 2019). O uso de anestésico inalatório garante maior controle do plano anestésico, permitindo aprofundar ou reduzir a consciência do animal em poucos minutos.

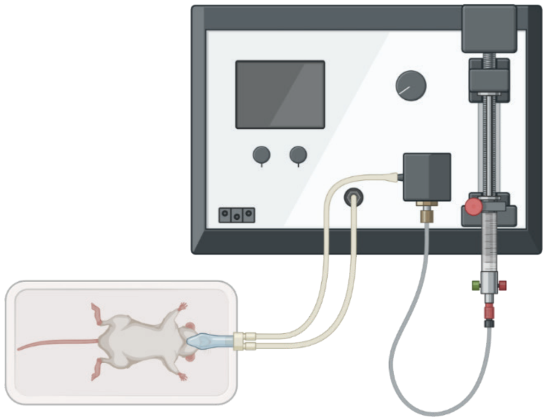


Fig.2: Sistema esquemático de anestesia inalatória em roedores.

Fonte: Ribeiro, Almeida, Oliveira, 2023.

Durante a execução do protocolo cirúrgico, parâmetros fisiológicos (temperatura, respiração e frequência cardíaca), sinais e condições clínicas devem ser monitorados e garantidos para evitar sofrimento ou procedimentos mal executados (BARRE-SINOUSSI, MONTAGUTELLI, 2015). Ao finalizar o procedimento cirúrgico, o pós-operatório deve prever todos os cuidados citados no tópico 2.3.

3.2 Oclusão de vasos e pedículo

Na indução de isquemias, o fluxo sanguíneo deve ser interrompido a partir de uma intervenção cirúrgica, por isso, diversos protocolos ou oclusões de vasos para esse fim podem ser utilizados. Alguns procedimentos apresentam grau de invasividade menos severo, como, por exemplo, a oclusão de veia ou artéria femoral. Já outros podem ser mais invasivos, como a oclusão do pedículo renal para indução de síndrome cardiorrenal, que requer acesso à cavidade abdominal, configurando-se como um protocolo cirúrgico de maior porte e complexidade (NERES-SANTOS *et al.*, 2021).

Protocolos anestésicos inalatórios podem ser utilizados, como já mencionado. No entanto, vale salientar que, apesar dos aparelhos de anestesia inalatória apresentarem diversas vantagens, a indisponibilidade desses equipamentos nas instituições promove o uso de anestésicos injetáveis em larga escala. Por essa razão, muitos grupos de pesquisa utilizam anestésicos injetáveis em diferentes combinações farmacológicas, sendo a mistura de cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina a mais comum (NERES-SANTOS *et al.*, 2021). Apesar de os anestésicos injetáveis também serem eficientes em determinados protocolos cirúrgicos, devemos considerar possíveis intercorrências e interações medicamentosas que essas combinações podem apresentar, como, por exemplo, o uso

de anestésicos agonistas alfa adrenérgicos, que produzem efeito vasoconstritor periférico (STABILE *et al.*, 2003). A interferência de tais combinações em protocolos cirúrgicos pode causar também prejuízos respiratórios e cardiovasculares. No pós-operatório, o grau de invasividade da oclusão realizada deve ser considerado para estabelecimento de procedimentos analgésicos, utilização de anti-inflamatório e antibiótico.

3.3 Canulações

Em protocolos que visam à coleta de sangue de forma contínua ou infusões de drogas através de veias e artérias por um período considerável de tempo, comumente se utiliza um protocolo cirúrgico para fixar uma cânula ou um cateter de silicone de acesso a um vaso. A cânula é mantida no interior do vaso, a partir de uma sutura ou amarração realizada externamente a ele, permitindo uma fixação segura (PRITCHETT-CORNING *et al.*, 2011).

Nesse protocolo, a indução anestésica pode ser feita com isoflurano a 5% e a manutenção com isoflurano de 1% a 2%. Técnicas de assepsia devem ser previamente aplicadas no animal, além de avaliação da profundidade do plano anestésico, que poderá ser realizada por meio do pinçamento da pele na região interdigital (PRITCHETT-CORNING *et al.*, 2011). A tricotomia deve ser realizada, se necessária, utilizando um aparelho elétrico apropriado e, então, inicia-se a cirurgia.

Incisões cutâneas são realizadas, seguidas de dissecação muscular para exposição de vasos, como no caso de procedimentos realizados na aorta carótida ou na veia jugular. Através de uma pequena arteriotomia ou venotomia, a cânula é inserida em aproximadamente 12 mm e fixada com dois pontos de sutura, um distal e outro proximal à incisão realizada no vaso. Após a sutura de fixação, deve-se atentar ao fluxo sanguíneo ideal, evitando compressão e redução da luz do vaso com a cânula (VAN WINKLE *et al.*, 2013).

Visando manter a estabilidade e funcionalidade da cânula, é preciso fixá-la de modo a permitir a movimentação normal do animal e, ao mesmo tempo, longe do seu alcance, evitando o seu acesso. Com esse propósito, é comum fixar a cânula através da fáscia superficial no pescoço, lateralmente à parede corporal (Figura 3), com um fio de seda 4.0. Para isso, deve ser garantida folga suficiente para flexão do pescoço do animal. A cânula é levada até a porção posterior do pescoço, na região da nuca, onde é realizada uma pequena incisão para fixação com uma sutura e possibilitando o acesso externo com adaptador para conexão de seringa (VAN WINKLE *et al.*, 2013).



Fig. 3 - Cateter e/ou canulação esquemática de vasos em roedores.

Fonte: Ribeiro, Almeida, Oliveira, 2023.

Os cuidados pós-operatórios para os protocolos apresentados neste tópico devem ser considerados conforme citados anteriormente no item 2.3.

3.4 Cirurgia do sistema nervoso central e periférico em roedores

O desenvolvimento de estudos relacionados à neurociência se deve, dentre muitas técnicas, à habilidade de acesso a regiões específicas do encéfalo a partir de protocolos cirúrgicos conhecidos como estereotaxia (FORNARI *et al.*, 2012). Esse acesso tem permitido descobertas científicas de grande importância, uma vez que possibilita o estudo e manipulações do encéfalo em organismos vivos, permitindo a visualização de comportamentos e alterações fisiológicas em tempo real (FORNARI *et al.*, 2012; KEISER, CHEN, DAVIDSON, 2018;). A estereotaxia (Figura 4) possibilita a implantação de cânulas metálicas em uma região específica de interesse, permitindo, por exemplo, a infusão de vetores virais adeno-associados objetivando terapias gênicas; drogas de ação curta; infusões contínuas a partir de minibombas osmóticas e microdiálises para análise do fluido cefalorraquidiano, dentre outras aplicações (MESSIER, EMOND, ETHIER 1999; PRITCHETT-CORNING *et al.*, 2011; FORNARI *et al.*, 2012; KEISER, CHEN, DAVIDSON, 2018). Todas essas metodologias excluem a barreira hematoencefálica que, muitas vezes, é um obstáculo considerável a diversos protocolos em neurobiologia (MESSIER, EMOND, ETHIER, 1999; FORNARI *et al.*, 2012; KEISER, CHEN, DAVIDSON 2018). Além disso, permitem a implantação de eletrodos para estimulação ou registros de sinais eletroencefalográficos e implantação de fibras ópticas para estudos relacionados à optogenética, dentre outras abordagens (FORNARI *et al.*, 2012).

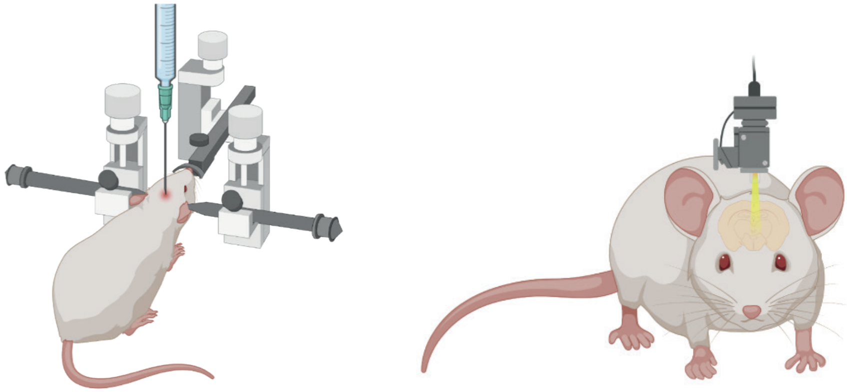


Fig. 4 - Aparato esquemático para estereotaxia e optogenética em roedores.

Fonte: Ribeiro, Almeida, Oliveira, 2023.

O que permite o acesso preciso a estruturas encefálicas é a referência de pontos superficiais presentes nos ossos craniais, como o bregma (ponto de encontro dos ossos frontal e parietais na intersecção das suturas sagital e coronal) e lambda (ponto de encontro dos ossos occiptal e parietais na intersecção das suturas sagital e lambdoidal), quando o animal está posicionado no aparato esterotáxico (MESSIER, EMOND, ETHIER, 1999). A partir de um atlas para cirurgias estereotáxicas, é possível determinar as coordenadas anteroposterior (AP), médio-lateral (ML) e dorsoventral (DV) (FENG *et al*., 2022).

O protocolo cirúrgico geral deve ser considerado, assim como discutido nos tópicos anteriores para as cirurgias abdominais, oclusões ou canulações de vasos. Porém, algumas características da cirurgia estereotáxica devem ser sublinhadas, como a precisão dos parâmetros necessários para acessar determinada região, uma vez que erros milimétricos podem comprometer a execução do protocolo cirúrgico (MESSIER, EMOND, ETHIER 1999; FENG *et al*., 2022). Neste sentido, deve-se considerar a linhagem e idade do animal utilizado devido às variações anatômicas que podem comprometer as coordenadas pré-estabelecidas (FENG *et al*., 2022). Ademais, deve-se considerar o volume injetado em uma determinada região, o qual pode variar devido ao tamanho e à estrutura neuroanatômica, visando promover dano tecidual mínimo (MESSIER, EMOND, ETHIER 1999; KEISER, CHEN, DAVIDSON, 2018). Assim, estudos pilotos e injeções com corantes podem ser necessários para padronizar e refinar o protocolo cirúrgico e, por conseguinte, reduzir o número de animais utilizados na pesquisa (MESSIER, EMOND, ETHIER 1999).

Acrílicos ou resinas odontológicas para fixação de cânulas ou conectores com eletrodos sobre o crânio devem ser utilizados com o máximo de cuidado, por serem neurotóxicos, uma vez que tal efeito deve ser evitado ou minimizado. Para que a adesão ocorra de forma apropriada e não se desprenda, é necessário que o osso do crânio

esteja devidamente limpo e seco antes da aplicação do acrílico odontológico. No caso de implantação de cânulas, um mandril deve ser inserido dentro da cânula para selar o interior durante o período em que não há manipulação ou infusões de líquidos, evitando contaminações ou entupimento da cânula guia (MESSIER, EMOND, ETHIER, 1999).

Protocolos cirúrgicos para estereotaxia permitem manutenções de cânulas, eletrodos e fibras ópticas no animal por dias, semanas e até meses. Entretanto, sugere-se manter o animal em recuperação entre 5 e 7 dias antes do início dos experimentos, evitando quaisquer interferências nos resultados obtidos (FORNARI *et al.*, 2012). Além disso, procedimentos pós-operatórios padrão para recuperação do plano anestésico devem ser considerados. Vale salientar que a maioria das cirurgias estereotáxicas são minimamente invasivas e a recuperação do animal é relativamente rápida (KEISER, CHEN, DAVIDSON, 2018).

Protocolos cirúrgicos para indução de lesão medular são recorrentes no campo da neurociência, apesar de serem considerados complexos devido ao grau de invasividade. Na execução desses protocolos, deve-se considerar o uso de analgésicos opioides cerca de 30 minutos antes do início da cirurgia, como buprenorfina 0.01 a 0.05 mg/kg (TORELLI *et al.*, 2022).

Na indução anestésica, sugere-se isoflurano a 5% e uma concentração de 1 a 2% para manutenção do plano anestésico, ambos acrescidos de oxigênio medicinal. Técnicas de assepsia e tricotomia devem ser adotadas. Em seguida, uma incisão é realizada na pele, que então deve ser divulsionada para acesso aos músculos. Incisões laterais à coluna são feitas e, com um afastador, a vértebra é acessada para uma laminectomia com posterior contusão ou lesão da medula. A lesão medular poderá ser obtida por meio de equipamento específico (Impactor, New Jersey, USA) que permite controle de altura e peso de um bastão metálico ao ser lançado em queda livre sobre a medula. Após a lesão, os músculos são suturados separadamente e a pele suturada em sequência (Figura 5) (TORELLI *et al.*, 2022; SANGANAHALLI *et al.*, 2021).

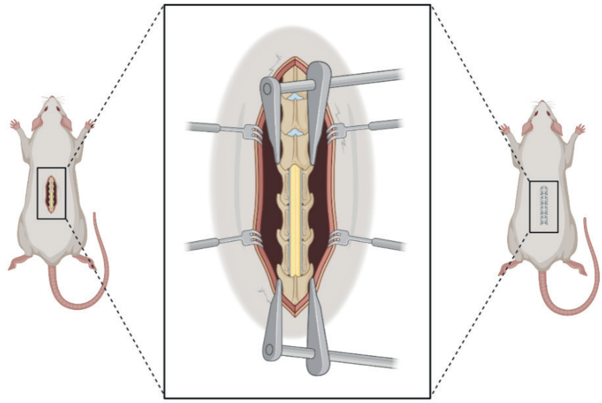


Fig. 5- Representação de acesso cirúrgico da medula espinal de roedores.

Fonte: Ribeiro, Almeida, Oliveira, 2023.

O fornecimento de isoflurano é interrompido ao fim do procedimento de lesão medular, contudo, o suprimento de oxigênio deve ser mantido por cerca de 5 a 15 minutos ou até o animal recuperar-se do plano anestésico. O pós-cirúrgico deve ser acompanhando atentamente com manejo de analgesia (buprenorfina 0.01 a 0.05 mg/kg a cada 8 horas) e antibiótico (amoxicilina 15 mg/kg). Nesse protocolo cirúrgico, deve-se verificar a eliminação urinária e, com frequência, será necessário realizar o esvaziamento da bexiga do animal por meio de massagens (duas ou três vezes ao dia), pois o fluxo urinário pode ser prejudicado. Hidratação subcutânea com salina e suplementação alimentar por via parenteral podem ser requeridas (SANGANAHALLI *et al*., 2021; TORELLI *et al*., 2022).

Em estudos relacionados à dor neuropática em ratos e camundongos, o procedimento de ligamentos em nervos periféricos (Figura 6) é essencial para reproduzir o modelo da doença, possibilitando estudos de mecanismo (ASHBY *et al*., 2019).

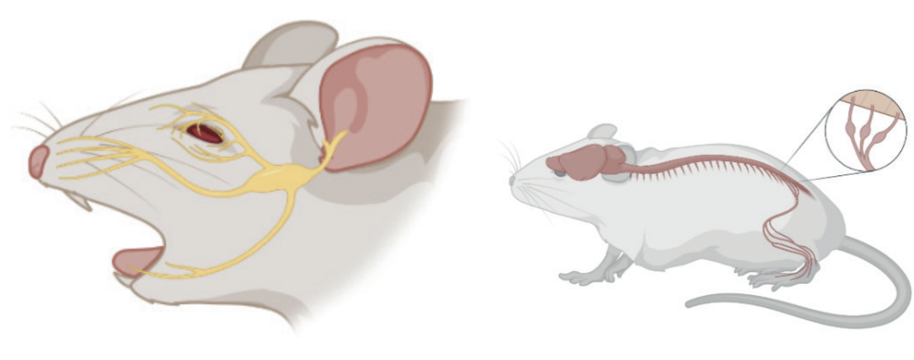


Fig. 6 - Esquema anatômico de nervos para acesso e indução de dor neuropática em roedores.

Fonte: Ribeiro, Almeida, Oliveira, 2023.

Neste sentido, podem ser considerados os procedimentos contidos nos protocolos cirúrgicos apresentados anteriormente neste capítulo. Nesse modelo experimental, os procedimentos objetivam a indução de nocicepção (sensibilização de vias que induzem desconforto e sensações dolorosas), o que frequentemente impossibilita o uso de analgésicos, que podem mascarar os resultados obtidos. Por essa razão, tais estudos necessitam de justificativas plausíveis (ASHBY *et al*., 2019).

4 | AVALIAÇÃO E APLICAÇÃO DO PONTO FINAL HUMANITÁRIO EM CIRURGIA EXPERIMENTAL

Todos os procedimentos cirúrgicos comentados até o momento, bem como muitos outros modelos experimentais, podem, sob algumas circunstâncias, acabar resultando em sofrimento, dor e angústia aos animais. Em todos os casos, o pesquisador responsável e sua equipe deverão encerrar antecipadamente o estudo proposto. Esse desfecho precoce, chamado de ponto final humanitário (*endpoint*, do inglês), difere do encerramento normal de uma pesquisa, que ocorre quando os objetivos científicos foram alcançados, pois o primeiro deve ser adotado sempre em qualquer circunstância em que haja comprometimento significativo ao bem-estar animal. Dessa forma, o encerramento do estudo deve ser antecipado na tentativa de impedir o prolongamento desnecessário do sofrimento, visto que alterações no bem-estar animal impactam negativamente na confiabilidade dos dados de uma pesquisa (RICHMOND, 1999; MORTON, 2005; BRASIL, 2022).

Por definição, o ponto final humanitário é um indicador precoce de dor e/ou distresse (potenciais ou efetivos) em experimentos com animal, que pode ser usado para evitar ou aliviá-los, funcionando como ferramenta de refinamento, um dos princípios básicos dos 3R's de Russel e Burch (RICHMOND, 1999; OECD, 2000). Em suma, o ponto final humanitário é o ponto de referência de sinais característicos de dano ao bem-estar animal que impõe a necessidade de ações corretivas ou interruptivas imediatas. Vale ressaltar que os parâmetros humanitários devem sempre ser ponderados em relação aos objetivos científicos do estudo, de modo a permitir que estes sejam alcançados, desde que devidamente inseridos num contexto moral e eticamente justificados (OLFERT *et al*., 1988; HENDRIKSEN, MORTON, 1999; ASHALL, MILLAR, 2014). Antes mesmo de submeter um projeto de pesquisa à apreciação pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) institucional, deve-se considerar a adoção de *endpoints* adequados para a espécie proposta no estudo. Para isso, é necessário prever todas as intercorrências potencialmente prejudiciais ao bem-estar animal durante a execução do protocolo, bem como ações corretivas ou interruptivas. A implementação de *endpoints* é imprescindível para evitar sofrimento prolongado e/ou excessivo, principalmente nos casos em que a dor ou o distresse é parte necessária do protocolo. Por outro lado, quando não for possível estimar o potencial de morbidade ou mortalidade de uma determinada abordagem experimental, é altamente recomendável

a adoção de estudos pilotos prévios, a fim de se obter parâmetros mais confiáveis na aplicação de *endpoints* ao protocolo experimental (OLFERT, 1995; OLFERT *et al.*, 1988).

Embora a eutanásia seja a estratégia de desfecho mais comumente utilizada na experimentação animal, essa deve ser a última alternativa possível a ser considerada. Ainda que o *endpoint* adequado dependa de cada cenário, em muitos casos, o alívio da dor, desconforto ou distresse pode ser obtido por meio de estratégias como analgesia, exclusão do animal afetado do estudo, cirurgia reparadora, alterações na quantidade de animais por gaiola, ajustes de temperatura, implementação de programas de enriquecimento ambiental, satisfação de necessidades sociais, disponibilização de animais para adoção, dentre outras opções (GONZALEZ *et al.*, 2000; LEACH, THORNTON, MAIN, 2008; CARBONE, 2012; SPANGENBERG, KEELING, 2016). Independentemente da estratégia adotada, na elaboração correta de um *endpoint* é indispensável o conhecimento do comportamento normal e de indicativos de alterações comportamentais na espécie animal (OECD, 2000).

Por outro lado, em estudos em que a morte do animal é a única opção de desfecho, é importante salientar que o método de eutanásia a ser aplicado deve ser adequado à espécie e à idade do sujeito experimental (BRASIL, 2018). Métodos aceitos sob restrição, como a decapitação por guilhotina, por exemplo, podem ser utilizados em alguns protocolos de pesquisa, desde que justificados e devidamente aprovados pela CEUA competente, a qual julgará, inclusive, os méritos éticos e científicos da pesquisa. Nesses casos, é de fundamental importância que sejam previstas antecipadamente todas as situações possíveis e seus desfechos humanitários, a fim de evitar o sofrimento animal.

Na aplicação de um *endpoint,* é imprescindível que haja a observação do bem-estar animal, que pode ser avaliado por meio de indicadores clínico-comportamentais, patofisiológicos e/ou bioquímicos. Atividade, postura corporal, agressividade, resposta ao manuseio, vocalização, *grooming* e estereotipias são exemplos de parâmetros clínico-comportamentais que podem ser avaliados. Alterações na frequência cardiorrespiratória, na contagem de células sanguíneas e no peso corpóreo, bem como a perda de hidratação e a anúria podem ser importantes marcadores patofisiológicos. Por sua vez, a avaliação de proteínas de fase aguda, catecolaminas, corticosteroides e hormônios como insulina, glucagon e prolactina são importantes parâmetros bioquímicos que, em conjunto com os parâmetros comportamentais e patofisiológicos, podem ser utilizados como critérios de decisão para ponto final humanitário.

Adicionalmente às evidências clínicas e comportamentais (possivelmente as mais facilmente observáveis), alguns parâmetros hormonais têm sido utilizados para mensurar o sofrimento animal, tais como catecolaminas, corticosteroides, prolactina, fator de necrose tumoral, interleucinas, dentre outros (OLFERT *et al.*, 1988). É importante notar que, em determinados casos, alterações clínico-comportamentais podem ser, na verdade, consequências tardias de falhas na manutenção da homeostase em resposta ao estresse (MCEWEN, 2003; MCEWEN, SEEMAN 1999, 2000; MCEWEN, WINGFIELD 2003a;

MCEWEN, WINGFIELD 2003b). Em certos casos, tais alterações poderiam ser detectadas precocemente por métodos bioquímicos, moleculares ou outros, especialmente quando o protocolo de pesquisa prevê coleta sanguínea (OLFERT *et al.*, 1988). De qualquer modo, independentemente do método de avaliação, o ponto final humanitário deve ser aplicado o mais precocemente possível, a fim de evitar que os animais atinjam um estado moribundo ou de morte iminente (HENDRIKSEN, MORTON, 1999). Dessa forma, o emprego tardio do ponto final humanitário pode caracterizar-se como uma negligência inconcebível e grave ao bem-estar animal.

A aplicação verdadeiramente eficaz (e, portanto, ética) do ponto final humanitário depende diretamente dos pesquisadores nos quesitos experiência e aptidão em distinguir características normais e anormais da espécie, capacitação, treinamento, engajamento, dedicação e senso de responsabilidade; e tais premissas se aplicam a todos os indivíduos envolvidos no uso e cuidado dos animais, o que inclui pesquisadores, colaboradores técnicos e discentes (HAU, 1999; OLFERT *et al.*, 1988; OLFERT, 1995).

A experiência do pessoal envolvido com a pesquisa com biomodelos é importante para o reconhecimento de algumas situações não convencionais, visto que algumas espécies são incapazes de manifestar alterações físicas e/ou comportamentais, mesmo em situações de angústia e/ou dor severa (OECD, 2000). Em camundongos submetidos a pequenas cirurgias, por exemplo, apenas sinais de dor e sofrimento consideráveis são normalmente detectáveis no pós-operatório, tais como piloereção, postura curvada, apatia, agressividade e automutilação (BAUMANS *et al.*, 1994; HAWKINS, 2002; BAUMANS, 2004; VAN SLUYTERS, OBERNIER, 2004). Portanto, para a aplicação adequada de um *endpoint,* é necessário que haja um constante e minucioso monitoramento do bem-estar por parte da equipe durante todo o experimento, através de estratégias de avaliação, como o uso de *checklists* ou escalas adequadas para cada espécie e cada procedimento (MORTON, 2005). Tais instrumentos devem considerar os parâmetros preditivos específicos a serem avaliados e a atribuição de escores a fim de minimizar a subjetividade da análise, conforme exemplo no quadro 2.

Os parâmetros devem ser registrados individualmente para cada animal e os escores obtidos deverão ser somados. O resultado dessa soma será considerado de acordo com uma faixa previamente estabelecida (e devidamente validada) de comprometimento do bem-estar do animal. Por sua vez, cada faixa de comprometimento determinará as ações a serem tomadas.

Parâmetro	Id animal: _____________	Escore	Data/ hora	Data/ hora
Perda de peso	Normal a 5%	0		
	5 a 10%	1		
	Acima de 10%	2		
Comportamento	Normal	0		
	Letargia	1		
	Agressividade/Apatia	2		
	Agressividade elevada/Irresponsividade	3		
Pele	Hidratada	0		
	Desidratação leve	1		
	Desidratação moderada	2		
	Desidratação grave	4		
Pelos	Limpo	0		
	Ausência de *Grooming*	1		
	Sujeira e acúmulo de descargas oculares e/ou nasais	2		
	Sujidade extrema	4		
Respiração	Normal	0		
	Levemente desconfortável	1		
	Forçada e/ou Sibilante	4		
		Outras observações		
		TOTAL		

Quadro 2. Exemplo de proposta simplificada para avaliação de animais cirurgiados[1]

[1]Adaptado de HAWKINS *et al*., 2011.

A soma dos escores determinará o grau de comprometimento do bem-estar animal e a ação requerida:

- 0 => padrão de normalidade;

- 1 a 3 escores => faixa de comprometimento leve => manter a observação;

- 4 a 7 escores => faixa de comprometimento moderado=> aumentar a frequência de observação e considerar uso de analgésicos e sedativos ou outras estratégias;

- 8 a 11 escores => faixa de comprometimento grave => consultar médico veterinário, cogitar medida de alívio imediato e considerar *endpoint*;

- 12 a 17 escores => faixa de comprometimento gravíssimo => *endpoint* inadiável.

O monitoramento deve ser realizado de maneira cuidadosa, seguindo os passos a seguir:

- Observação do comportamento espontâneo do animal no seu microambiente. Essa análise deve ser de forma silenciosa, no horário em que estão habitualmente

despertos, verificando aspectos como atividade, locomoção, pelagem, comportamento, postura, tamanho, peso e condição geral. Por exemplo, é comum que animais em sofrimento se mantenham isolados dos demais ou se tornem agressivos e/ou apresentem posturas curvas, pelos eriçados, magreza excessiva etc. Essa análise deve ser a mais discreta possível para evitar estresse dos animais com consequente alteração do comportamento.

- Avaliação individual. Nesta etapa, convém avaliar cada animal que esteja apresentando aspectos incomuns (normalmente visualizáveis já no passo anterior), observando minuciosamente o animal por inteiro: cabeça, abdômen, dorso, cauda, patas, focinho, olhos, vibrissas e orelhas; bem como coloração, presença e tamanho de massas tumorais, alopecia, caquexia, presença de secreções ou sinais de luta etc.

- Notificação do médico-veterinário responsável. A constatação de quaisquer alterações deve ser imediatamente comunicada ao médico veterinário responsável, que deverá investigar a causa e decidir qual intervenção deverá ser tomada.

- Registro das alterações e atribuição de escores. Todas as alterações devem ser devidamente registradas, avaliadas e classificadas segundo uma escala de escores previamente definida, de acordo com a intensidade, para cada parâmetro escolhido.

- Mensurar o grau de comprometimento do bem-estar animal. Esse dado será resultado da soma dos escores e o valor obtido deve indicar a faixa de comprometimento do bem-estar correspondente, bem como a ação requerida. Quanto maior o somatório, pior o estado do animal.

- Executar *endpoint*. Para cada faixa de comprometimento, uma intervenção específica deverá ser tomada, sendo a eutanásia a medida mais extrema. Nesta etapa, diversas ações podem ser requeridas com o objetivo de restabelecer o bem-estar animal, como, por exemplo, a adoção de tratamento sintomático/de suporte e ajuste do protocolo experimental. Quando a recuperação não for possível, a participação do animal no experimento deverá ser interrompida. Dependendo do comprometimento de seu bem-estar, a eutanásia deverá ser considerada. Em todo caso, tal decisão deve ser tomada após uma devida avaliação clínica que considere a gravidade da condição, quantidade de dor e sofrimento, o prognóstico e a potencial perda de dados relevantes para a pesquisa (OECD, 2000).

A seguir, uma lista de alguns sinais clínicos que, a depender da duração, gravidade e da resposta à terapia, podem ser fortes indicadores da necessidade de finalização humanitária para a maioria das espécies de animais de laboratório (NIH, 2022):

- Perda de peso rápida ou progressiva;

- anorexia e/ou ingestão insuficiente de líquidos;

- diarreia debilitante;

- pele desidratada;

- aumento da circunferência abdominal ou ascite;

- dermatites ou outras condições irresponsivas ao tratamento;

- acúmulo de sujeira no pelo e/ou postura curvada;

- letargia;

- perda do reflexo de correção ou falha em manter o equilíbrio;

- tosse, respiração forçada, descarga nasal, ofegância;

- icterícia, cianose e/ou palidez/anemia;

- sinais neurológicos (convulsões, paralisia, paresia, andar em círculos/inclinação da cabeça, cegueira);

- sangramentos espontâneos;

- trauma autoinduzido com exposição do músculo subjacente;

- qualquer outra condição que interfira em atividades normais (como comer e beber, construir ninhos, caminhar etc.);

- hipertermia ou Hipotermia excessivas ou prolongadas; e

- outros.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Todo protocolo que envolva o uso de biomodelos animais, especialmente aqueles relacionados a procedimentos cirúrgicos invasivos, deve ser cientificamente relevante e eticamente justificável.

- Pesquisadores devem priorizar o refinamento de técnicas cirúrgicas a fim de minimizar a dor ou o estresse dos animais.

- Protocolos devem ser constantemente revistos, visando detectar comprometimento no bem-estar dos animais.

- Em caso de ocorrência de sofrimento, dor e angústia nos animais, é inescusável que sejam adotados critérios de *endpoint* conforme legislação vigente.

REFERÊNCIAS

ABDEL-HALIM, R. E. Contributions of Ibn Zuhr (Avenzoar) to the progress of surgery: a study and translations from his book Al-Taisir. **Saudi Medical Journal**, 26(09): 1333-1339, 2005.

ASHALL, V. & MILLAR, K. Endpoint matrix: a conceptual tool to promote consideration of the multiple dimensions of humane endpoints. **ALTEX-Alternatives to Animal Experimentation**, 31(2): 209-213, 2014.

ASHBY, D. M.; LEDUE, J.; MURPHY, T. H.; MCGIRR, A. Peripheral Nerve Ligation Elicits Widespread Alterations in Cortical Sensory Evoked and Spontaneous Activity. **Scientific Reports,** 9(1): 1-10, 2019.

BARRE-SINOUSSI, F. & MONTAGUTELLI, X. Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. **Future Science OA**, 1(4), 2015.

BAUMANS, V. Methods for evaluation of laboratory animal well-being. **Alternatives to Laboratory Animals**, 32(1_suppl), 161-162, 2004.

BAUMANS, V.; BRAIN, P. F.; BRUGERE, H.; CLAUSING, P.; JENESKOG, T. & PERRETTA, G. Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphs: Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group on Pain and Distress accepted by the FELASA Board of Management November 1992. **Laboratory Animals**, 28(2): 97-112, 1994.

BENNETT, K. & LEWIS, K. Sedation and Anesthesia in Rodents. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, 25(1): 211-255, 2022.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Resolução Normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018. Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações, 15 fev. 2018. Disponível em: https://antigo.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/legislacao/Arquivos/Anexo_Res_Norm_37_2018_CONCEA_Pratica_Eutanasia.pdf. Acesso em: 11 dez. 2022.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). **Resolução nº 55, de 5 de outubro de 2022**. Atualiza o texto da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica - DBCA. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações, 07 out. 2022. Disponível em: https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea/arquivos/arquivo/legislacao/resolucao-normativa-no-55-de-5-de-outubro-de-2022.pdf. Acesso em: 11 dez. 2022.

CARBONE, L. Pain management standards in the eighth edition of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, 51(3), 322-328, 2012.

FENG, Z.; LI, A.; GONG, H. & LUO, Q. Constructing the rodent stereotaxic brain atlas: a survey. **Science China Life Sciences**, 65, 1-14, 2022.

FERREIRA, L. M.; HOCHMAN, B. & BARBOSA, M. V. J. **Modelos experimentais em pesquisa**. Acta Cirúrgica Brasileira, 20(2): 28-34, 2005.

FLECKNELL, P. **Laboratory animal anaesthesia**. Amsterdam: Academic press, 2015.

FORNARI, R. V.; WICHMANN, R.; ATSAK, P.; ATUCHA, E.; BARSEGYAN, A.; BELDJOUD, H.; MESSANVI, F.; THURING, C. M. A. & ROOZENDAAL, B. Rodent stereotaxic surgery and animal welfare outcome improvements for behavioral neuroscience. **Journal of Visualized Experiments**, 59: e3528, 2012.

GONZALEZ, M. I.; FIELD, M. J.; BRAMWELL, S.; MCCLEARY, S. & SINGH, L. Ovariohysterectomy in the rat: a model of surgical pain for evaluation of pre-emptive analgesia? **Pain**, 88(1): 79-88, 2000.

GRAF, R. P.; CINELLI, P. & ARRAS, M. Morbidity scoring after abdominal surgery. **Laboratory Animals**, 50(6): 453-58, 2016.

HAU, J. Humane endpoints and the importance of training. In: Hendriksen CFM & Morton DB. (Eds). **Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research. Proceedings of the International Conference**, 22-25 November 1998, Zeist, The Netherlands. London: The Royal Society of Medicine Press, 1999. p. 71-74.

HAWKINS, P. Recognizing and assessing pain, suffering and distress in laboratory animals: a survey of current practice in the UK with recommendations. **Laboratory Animals**, 36(4): 378-395, 2002.

HAWKINS, P.; MORTON, D. B.; BURMAN, O.; DENNISON, N.; HONESS, P.; JENNINGS, M.; LANE, S.; MIDDLETON, V.; ROUGHAN, J. V.; WELLS, S. & WESTWOOD, K. A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: eleventh report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. **Laboratory Animals**, 45(1): 1-13, 2011.

HENDRIKSEN, C. F. M.; MORTON, D. B. (Eds.). **Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research**. Proceedings of the International Conference, 22-25 Nov 1998 Zeist, The Netherlands. London: Royal Society of Medicine Press, 1999, 150 pp.

HINES, G. L. Blalock-Taussig Shunt at 75 a landmark operation and a triumph of diversity over prejudice. **Cardiology in Review**, 27(5): 219-21, 2019.

JAVID, P.; AYDIN, A.; MOHANNA, P. N.; DASGUPTA, P. & AHMED, K. Current status of simulation and training models in microsurgery: A systematic review. **Microsurgery**, 39(7): 655-668, 2019.

KEISER, M. S.; CHEN, Y. H. & DAVIDSON, B. L. Techniques for Intracranial Stereotaxic Injections of Adeno-Associated Viral Vectors in Adult Mice. **Current Protocols in Mouse Biology**, 8(4): e57, 2018.

LEACH, M. C.; THORNTON, P. D.; MAIN, D. C. J. Identification of appropriate measures for the assessment of laboratory mouse welfare. **Animal Welfare**, 17(2): 161-170, 2008.

LOH, C. Y. Y.; WANG, A. Y. L.; TIONG, V. T. Y.; ATHANASSOPOULOS, T.; LOH, M.; LIM, P.; KAO, H. K. Animal models in plastic and reconstructive surgery simulation—a review. **Journal of Surgical Research**, 221: 232-245, 2018.

MATSUMIYA, L. C.; SORGE, R. E.; SOTOCINAL, S. G.; TABAKA, J. M.; WIESKOPF, J. S.; ZALOUM, A.; KING, O. D. & MOGIL, J. S. Using the Mouse Grimace Scale to reevaluate the efficacy of postoperative analgesics in laboratory mice, **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, 51(1): 42-49, 2012.

MCEWEN, B. S. Mood disorders and allostatic load. **Biological Psychiatry**, 54(3): 200-207, 2003.

MCEWEN, B. S & SEEMAN, T. Protective and damaging effects of mediators of stress elaborating and testing the concepts of allostasis and allostatic load. **Annals of the New York Academy of Science**, 869(1): 30-47, 1999.

MCEWEN, B. S. & WINGFIELD, J. C. Response to commentaries on the concept of allostasis. **Hormones and Behavior**, 43(1): 28-30, (2003b).

MCEWEN, B. S. & WINGFIELD, J. C. The concept of allostasis in biology and biomedicine. **Hormones and Behavior**, 4(1): 2-15, 2003a.

MESSIER, C.; EMOND, S. & ETHIER, K. New techniques in stereotaxic surgery and anesthesia in the mouse. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, 63(2): 313-318, 1999.

MIWA, Y. & SLADKY, K. K. Small Mammals: Common Surgical Procedures of Rodents, Ferrets, Hedgehogs, and Sugar Gliders, **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, 19(1): 205-44, 2016.

MORTON, D. B. Guia para El punto final humanitário enlaexperimentación animal para lainvestigación biomédica: aspectos éticos, legales y prácticos. **Laboratory Animals**, 8: 5-12, 2005.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH (NIH). **Guidelines for Endpoints in Animal Study Proposals Issuing Office:** OACU; 2022. Disponível em: https://oacu.oir.nih.gov/system/files/media/file/2022-04/b13_endpoints_guidelines.pdf. Acesso em: 11 dez. 2022.

NAVARRO, K. L.; HUSS, M.; SMITH, J. C.; SHARP, P.; MARX, J. O.; PACHARINSAK, C. Mouse Anesthesia: The Art and Science. **ILAR Journal**, 62(1-2): 238-273, 2021.

NERES-SANTOS, R. S.; JUNHO, C. V. C.; PANICO, K.; CAIO-SILVA, W.; PIERETTI, J. C.; TAMASHIRO, J. A.; SEABRA, A. B.; RIBEIRO, C. A. J.; CARNEIRO-RAMOS, M. S. Mitochondrial Dysfunction in Cardiorenal Syndrome 3: Renocardiac Effect of Vitamin C. **Cells**, 10(11): 3029, 2021.

OECD. **Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation**. Paris: OECD; 2000. Acesso em: 11 dez. 2022.

OLFERT, E.; BHASIN, J.; LATT, R.; MACALLUM, E.; MCCUTCHEON, K.; RAINNIE, D. & SCHUNK, M. CCAC Guidelines on: Choosing an Appropriate Endpoint in Experiments Using Animals for Research. **Teaching and Testing**, 1988.

OLFERT, E. D. Defining an Acceptable Endpoint in Invasive Experiments. **Animal Welfare Information Center Newsletter**, 6(1): 3-7, 1995.

PRITCHETT-CORNING, K. R.; LUO, Y.; MULDER, G. B. & WHITE, W. J. Principles of rodent surgery for the new surgeon. **Journal of Visualized Experiments**, 47(6): e2586, 2011.

RICHMOND, J. Criteria for humane endpoints. *In*: HENDRIKSEN, C. F. M. & MORTON, D. B. (Eds.). **Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research**. Proceedings of the International Conference, 22-25 November 1998, Zeist, The Netherlands. London: The Royal Society of Medicine Press; 1999. p. 26-32.

SANGANAHALLI, B. G.; CHITTURI, J.; HERMAN, P.; ELKABES, S.; HEARY, R.; HYDER, F.; KANNURPATTI, S. S. Supraspinal sensorimotor and pain-related reorganization after a hemicontusion rat cervical spinal cord injury, **Journal of Neurotrauma**, 38(24): 3393-405, 2021.

SCHOLLMEYER, T.; SOYINKA, A. S.; SCHOLLMEYER, M. & MEINHOLD-HEERLEIN, I. Georg Kelling (1866-1945): the root of modern day minimal invasive surgery. A forgotten legend? **Archives of Gynecology and Obstetrics**, 276(5): 505-9, 2007.

SINGH, V. K.; SEED, T. M. **How necessary are animal models for modern drug discovery?** Expert Opinion on Drug Discovery, 16(12): 1391-1397, 2021.

SKORUPSKI, A. M.; ZHANG, J.; FERGUSON, D.; LAWRENCE, F. & HANKENSON, F. C. Quantification of induced hypothermia from aseptic scrub applications during rodent surgery preparation. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, 56(5): 562-569, 2017.

SPANGENBERG, E. M. & KEELING, L. J. Assessing the welfare of laboratory mice in their home environment using animal-based measures – a benchmarking tool. **Laboratory Animals**, 50(1):30-38, 2016.

STABILE, E.; BURNETT, M. S.; WATKINS, C.; KINNAIRD, T.; BACHIS, A.; LA SALA, A.; MILLER, J. M.; SHOU, M.; EPSTEIN, S. E. & FUCHS, S. Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in CD4-knockout mice. **Circulation**, 108(2): 205-10, 2003.

STASIAK, K. L.; MAUL, D.; FRENCH, E.; HELLYER, P. W. & VANDEWOUDE, S. Species-specific assessment of pain in laboratory animals. Contemporary Topics in **Laboratory Animal Science**, 42(4):13–20, 2003.

TORELLI, A. G.; CRISTANTE, A. F.; DE BARROS-FILHO, T. E. P.; DOS SANTOS, G. B.; MORENA, B. C.; CORREIA, F. F. & PASCHON, V. Effects of ganglioside GM1 and erythropoietin on spinal cord injury in mice: Functional and immunohistochemical assessments. **Clinics**, 77: 100006, 2022.

ULLMAN-CULLERE, M. H. & FOLTZ, C. J. Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice. **Laboratory Animal Science**, 49:319-23, 1999.

VAN SLUYTERS, R. C. & OBERNIER, A. Guidelines for the care and use of mammals in neuroscience and behavioral research. **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science / American Association for Laboratory Animal Science**, 43(2): 48-52, 2004.

VAN WINKLE, J. A.; CHEN, B.; LEI, I. F.; PEREIRA, B.; RAJPUT, P. S. & LYDEN, P. D. Concurrent middle cerebral artery occlusion and intra-arterial drug infusion via ipsilateral common carotid artery catheter in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, 213(1): 63-69, 2013.

ZHANG, J.; BI, J. J.; GUO, G. L.; YANG, L.; ZHU, B.; ZHAN, G. F.; LI, S.; HUANG, N. N.; HASHIMOTO, K.; YANG, C. & LUO, A. L. Abnormal composition of gut microbiota contributes to delirium-like behaviors after abdominal surgery in mice. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, 25(6): 685-696, 2019.

ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS EM TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA

Data de aceite: 03/07/2023

Amanda dos Santos Cavalcanti
Unidade de Pesquisa Experimental em Ortopedia, Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, Rio de Janeiro, RJ
ORCID 0000-0002-8792-7524

Pablo Corrêa Costa de Almeida
Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético, Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, Rio de Janeiro, RJ
ORCID 0009-0006-0684-8960

João Antônio Matheus Guimarães
Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, Rio de Janeiro, RJ
ORCID 0000-0002-4088-044X

1 | USO DE MODELOS ANIMAIS EM ORTOPEDIA

A pesquisa pré-clínica na área de Traumatologia e Ortopedia se baseia em biomodelos que mimetizam as situações clínicas. As principais patologias ósseas modeladas em animais são osteoporose, tumores ósseos, lesões na cartilagem, osteomielite e infecções associadas a implantes e fraturas e perdas e ósseas (Figura 1). Neste capítulo, vamos abordar de forma geral algumas dessas patologias e detalharemos os cuidados com os animais no dia a dia da Unidade de Pesquisa Experimental em Ortopedia do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, hospital referência nacional para ortopedia e traumatologia do Ministério da Saúde (Brasil).

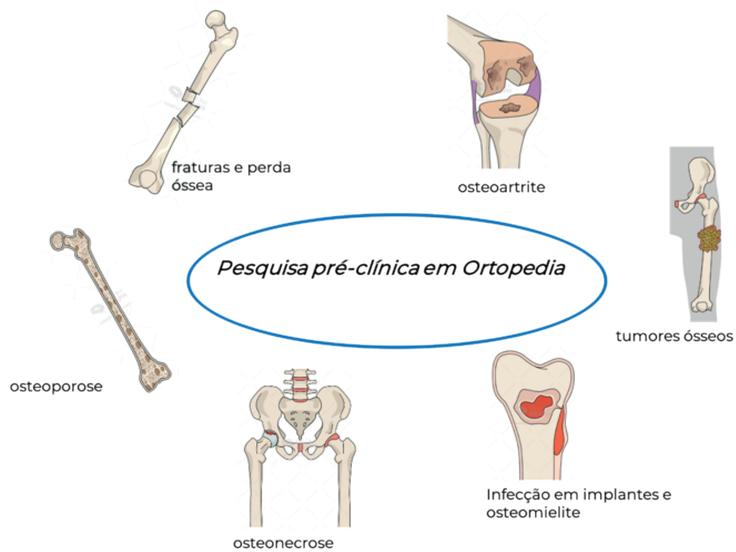


Figura 1. Principais patologias e condições clínicas da Ortopedia e Traumatologia modeladas em animais.

Fonte: Esquema criado pelos autores com www.mindthegraph.com

1.1 Fraturas e perda óssea

Na cirurgia ortopédica, os defeitos segmentares críticos são abordados com as técnicas de distração osteogênica ou o transporte ósseo interno com fixador externo, com o uso de enxertos ósseos vascularizados e por meio da técnica da membrana induzida descrita por Alain Masquelet (MASQUELET; BEGUE, 2010). Com a modelagem em animais de laboratório, é possível reproduzir situações para testes de novos biomateriais para substituir o uso de enxertos autólogos e a técnica da membrana induzida.

São diversas as situações em que é necessário o uso de enxerto ósseo autólogo, não só para reposição de perdas ósseas extensas, como também para indução da consolidação óssea em fraturas, pseudoartroses, artodeses vertebrais, dentre outras. Classicamente, para ocorrer a regeneração óssea, são necessários três componentes: osteoindução, osteocondução e osteogênese. Os substitutos ósseos em si oferecem boa osteocondução, mas a osteogênese e osteoindução são alcançadas mediante estímulo biológico. Apesar de o enxerto ósseo autólogo ser considerado o padrão-ouro, sua obtenção é um procedimento cirúrgico que apresenta limitações, como complicações no sítio doador como infecção, formação de seroma, hematoma, dor crônica, instabilidade pélvica e hérnias em até 21,8% dos pacientes (TZIOUPIS; GIANNOUDIS, 2007). Além disso, há limitação da quantidade de enxerto e o aumento do tempo cirúrgico para obtê-lo. Desta forma, o desenvolvimento de substitutos ósseos sintéticos, bem como de tecnologias da medicina regenerativa, são objetos de intensa investigação com o intuito de substituir o uso enxerto ósseo autólogo.

Para tanto, testes *in vivo* são realizados em modelos animais de perda óssea.

A mimetização da perda óssea depende da criação de um defeito de "tamanho crítico", ou seja, aquele que, apesar da estabilização cirúrgica, não cicatriza espontaneamente e requer intervenção cirúrgica adicional. Os principais modelos animais aplicados nessa área do conhecimento/de pesquisa são o defeito em calvária, os defeitos ósseos segmentares e o defeito cortical parcial.

Os defeitos ósseos segmentares e em calvária são os mais amplamente descritos e usados na literatura. A regeneração de ossos da calvária é, em muitas situações, um desafio na medicina (RAY *et al.*, 2020; TIAN *et al.*, 2018). Fraturas de crânio derivadas de quedas, acidentes automobilísticos e outras etiologias estão presentes entre 30% e 70% de todos os traumas envolvendo adultos (SITTITAVORNWONG; MORLANDT, 2013). Além disso, defeitos segmentares no crânio podem resultar, ainda, de procedimentos cirúrgicos como craniotomias e craniectomias de descompressão em pacientes que tiveram aumento da pressão intracraniana (ALKHAIBARY *et al.*, 2020). Esse contexto direciona os esforços para a busca de estratégias que acelerem o processo de regeneração óssea. O defeito em calvária consiste na criação de uma incisão circular na calvária – mais comumente no osso parietal - abrangendo toda a profundidade do osso. O tamanho de defeito crítico varia com a espécie e localização do defeito (Figura 2).

Na nossa prática, realizamos a criação do defeito usando uma broca trefina com irrigação salina para prevenir danos ao osso hospedeiro circundante. Senos e Hankenson refinaram o tradicional modelo realizado com broca manual, substituindo-o pelo uso de equipamento piezoelétrico (Piezosurgery® GP, Mectron Medical Technology, Carasco, Itália), reduzindo drasticamente as complicações advindas do modelo original (SENOS; HANKENSON, 2020). O disco ósseo excisado é removido cuidadosamente para evitar danos à dura-máter. O substituto a ser testado é colocado no defeito e o periósteo é, então, reposicionado e o retalho de pele sobrejacente é fechado com suturas. Esse modelo é utilizado como prova de conceito da capacidade de indução da regeneração óssea de novos substitutos após os testes *in vitro*.

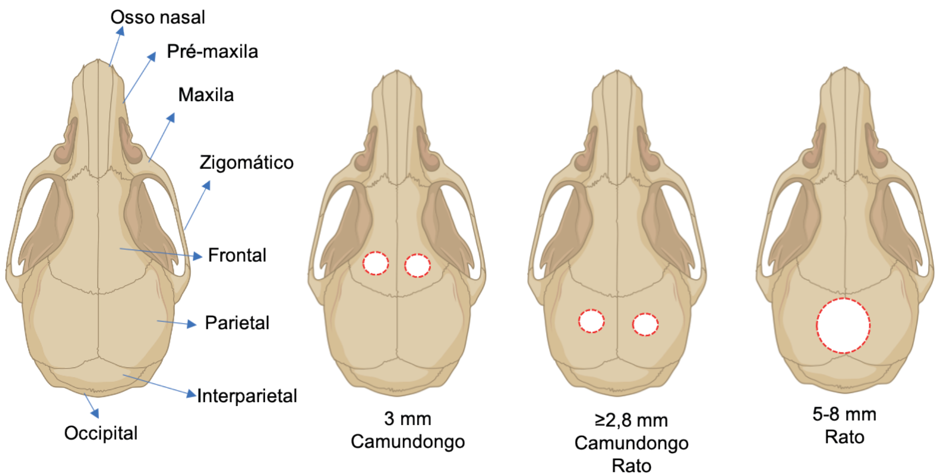


Figura 2. Criação de defeito calvária em ratos e camundongos.

Fonte: Esquema criado pelos autores em www.BioRender.com

Os defeitos segmentares em ossos longos consistem na criação de um defeito de tamanho crítico (CSD, do inglês *critical-sized defect*), usando uma abordagem de osteotomia em que uma broca ou serra é usada para remover o segmento necessário de um local predeterminado no osso (Figura 3). Em ossos longos, é geralmente aceito que o tamanho do defeito deve ser de 2 a 2,5 vezes o diâmetro do osso longo (LINDSEY *et al.*, 2006). No entanto, um CSD não é apenas determinado por seu tamanho, mas também por outros fatores, como a idade e espécie do animal, o defeito da localização, estrutura óssea, presença do periósteo, carga aplicada e a condição metabólica e sistêmica do animal, bem como pelo dispositivo de fixação usado para estabilizar o osso defeito e para permitir um retorno precoce à mobilidade (GLATT; MATTHYS, 2014).

Em nosso laboratório, estabelecemos modelo com fixação rígida com placa posicionada na face cranial do fêmur; a placa é fixada com parafusos bloqueados, o que provê uma boa estabilização mecânica. Uma vez fixada a placa, é realizada a osteotomia para criação do defeito crítico no terço médio da diáfise femoral de 5 mm em ratos e de 2,5mm em camundongos.

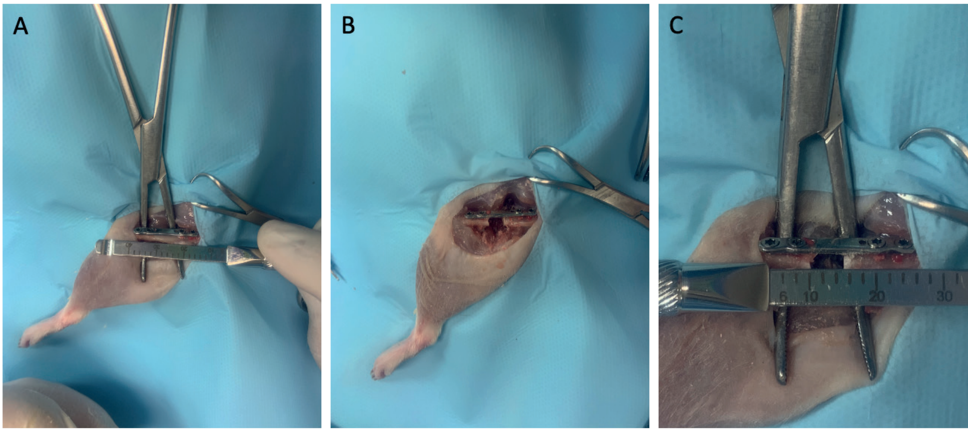


Figura 3. Modelo de defeito crítico segmentar realizado na Unidade de Pesquisa Experimental do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia. (A) Fixação da placa com parafusos bloqueados em fêmur de rato. (B) Criação do defeito de tamanho crítico. (C) Mensuração do defeito.

Fonte: Acervo INTO.

No modelo de defeito parcial, um orifício incompleto é perfurado na lateral do osso para criar uma área para colocação do substituto teste. O orifício geralmente penetra no osso cortical e pode se estender até o osso esponjoso subjacente ou a cavidade da medula óssea. Nesse modelo, geralmente apenas um lado do osso é usado e é aplicado para avaliação de materiais sem a necessidade de material de síntese (placas e parafusos) em ossos longos, que são modelos mais adequados para o tipo de ossificação que ocorre em membros em humanos (MCGOVERN; GRIFFIN; HUTMACHER, 2018).

Já para a mimetização da técnica da membrana induzida, após a ressecção da porção central da diáfise do fêmur, criamos o defeito crítico seguido da fixação com haste intramedular e preenchimento do defeito com espaçador de cimento ósseo. Após seis semanas do procedimento cirúrgico, há a formação da membrana induzida semelhante à observada em humanos (GUIMARÃES *et al*., 2023, no prelo).

1.2 Osteoporose

A Osteoporose é uma doença silenciosa, de difícil diagnóstico e que, conjuntamente a outros fatores, aumenta o risco de fraturas e necessidade de procedimentos cirúrgicos. Fraturas osteoporóticas são de difícil resolução clínica, resultando em altos índices de morbidade e mortalidade. A doença é a causa mais comum de fraturas vertebrais causadas por traumas de baixa energia, as chamadas fraturas osteoporóticas ou fraturas por fragilidade óssea (TOMÉ-BERMEJO; PIÑERA; ALVAREZ-GALOVICH, 2017).

Uma gama de intervenções farmacológicas tem se mostrado relevante para a redução do risco de fraturas em mulheres na pós-menopausa com osteoporose, todas objetivando

reduzir a reabsorção óssea. Porém, muitas vezes a osteoporose é identificada durante exames médicos de avaliação de uma fratura já ocorrida. O uso de modelos experimentais animais permite não só a elucidação dos mecanismos patológicos dessa doença, como também o estudo de agentes farmacológicos para seu tratamento (LELOVAS *et al.*, 2008).

O modelo animal de osteoporose em ratas induzido por ooforectomia (remoção dos ovários) é um modelo consolidado, reprodutível e amplamente estudado, sendo o modelo animal de osteoporose mais frequentemente utilizado (OHEIM *et al.*, 2016). Esse modelo mimetiza o efeito da privação do estrogênio sobre o tecido ósseo, reproduzindo as alterações ósseas observadas na menopausa e na ooforectomia em mulheres. Tal modelo utiliza ratas com maturidade sexual e esquelética que respondem de forma adequada à depleção de estrogênio, causada pela remoção dos ovários, manifestando as alterações ósseas decorrentes dessa depleção em aproximadamente 1 mês (BONUCCI; BALLANTI, 2014).

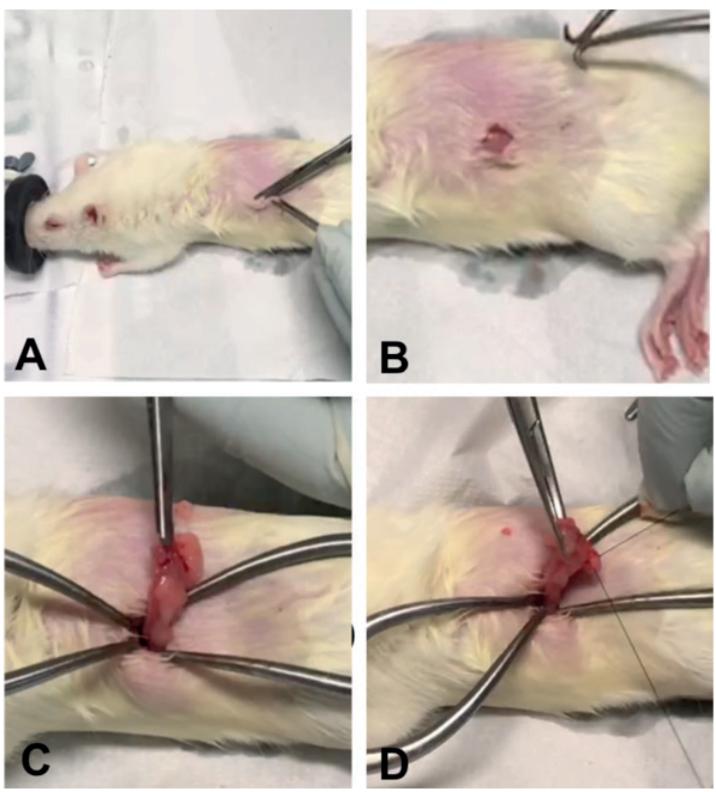


Figura 4. Ooforectomia em ratas. (A) Rata sob anestesia inalatória posicionada para ooforectomia. (B) Acesso, plano subcutâneo e visualização de musculatura. (C) Exposição do ovário e tuba uterina. (D) Ligadura e exérese do ovário.

Fonte: Acervo INTO.

1.3 Tumores ósseos

Na pesquisa oncológica translacional, os biomodelos são a principal ferramenta para ampliar o conhecimento sobre as neoplasias malignas. Eles são a base de estudos pré-clínicos com alvo no desenvolvimento racional de novas estratégias terapêuticas e sua validação antes da fase de ensaio clínico. A maior parte dos relatos em biomodelos de sarcomas ósseos deriva de experimentos realizados com células de tumores humanos expandidas *in vitro*. Contudo, há diversas limitações, como o baixo controle das condições experimentais, que resulta na contaminação das culturas com outras subpopulações celulares, e seleção de clones tumorais específicos nas passagens, com a consequente perda das propriedades biológicas intrínsecas do tumor (ARLETT, 2001; GILLET *et al.*, 2011).

Os modelos de tumor de xenoenxerto derivado do paciente (PDX, do inglês *patient-derived xenograft*) são obtidos por meio do transplante de fragmentos integrais de tumores humanos em animais imunodeficientes, sem expansão prévia das células neoplásicas. São considerados os modelos pré ou paraclínicos mais confiáveis pelo potencial em manter a heterogeneidade da população celular e as características moleculares do tumor original (TENTLER *et al.*, 2012). Dessa forma, é imperativo usar modelos que reproduzam com precisão o padrão e a biologia do crescimento do tumor humano (SAYLES *et al.*, 2019). O conjunto dessas características confere aos PDXs importância única para desenvolver novas estratégias terapêuticas e como ser utilizado como ferramenta preditora de resultados clínicos (HE *et al.*, 2019; HIGUCHI *et al.*, 2019). Por representar fielmente a heterogeneidade intra e intertumoral, o cenário pré-clínico de maior relevância para os PDXs são os testes com novos medicamentos.

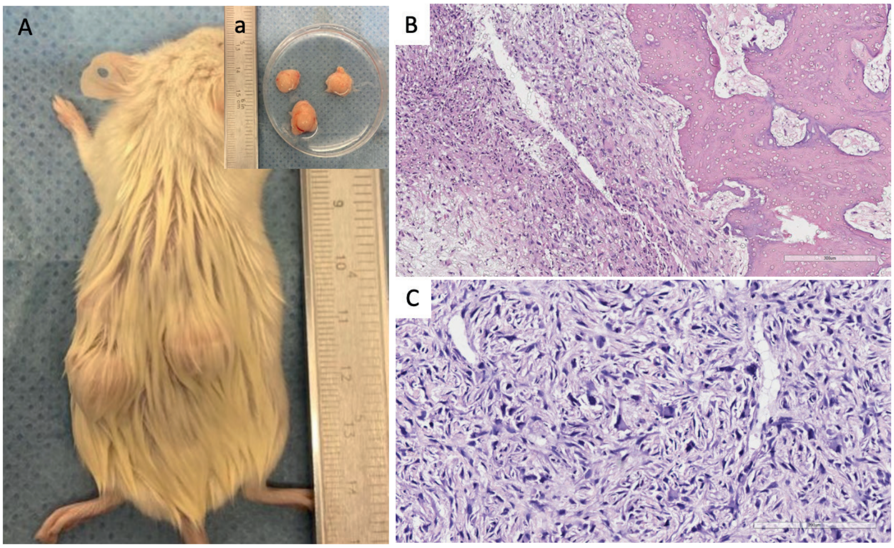


Figura 5. Modelo de tumor de xenoenxerto derivado do paciente (*Patient-derived xenograft* ou PDX). (A) Animal com fragmentos tumorais no tecido subcutâneo (modelo heterotópico). (a) Coleta dos tumores após eutanásia. (B) Aspecto microscópico do tumor parental (do paciente) evidenciando o subtipo histológico osteossarcoma clássico central caracterizado pela proliferação de células malignas pleomórficas e produção de matriz osteóide. (C) O pleomorfismo celular foi mantido até a segunda passagem no PDX.

Fonte: Acervo INTO.

2 | PRINCIPAIS ASPECTOS QUE IMPACTAM O BEM-ESTAR ANIMAL EM MODELOS ORTOPÉDICOS

Na maioria dos modelos citados, os pontos que mais preocupam e impactam o bem-estar animal são o procedimento cirúrgico em si e a necessidade de isolamento dos animais após o procedimento. Para minimizar o impacto desses procedimentos, alguns aspectos devem ser considerados antes, durante e após os procedimentos, para o correto planejamento experimental e controle das condições experimentais.

2.1 Planejamento experimental

Nosso planejamento experimental começa na elaboração do formulário para submissão na Comissão de Ética do uso de Animais do instituto. Um dos aspectos é o planejamento amostral considerando o desfecho e destino das amostras que serão coletadas e analisadas (Figura 6), principalmente quando não forem possíveis duas análises na mesma amostra.

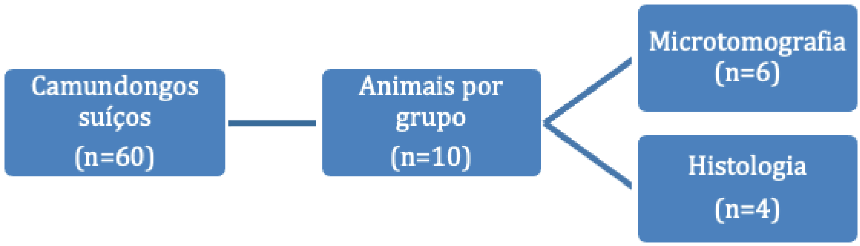


Figura 6. Exemplo do planejamento das análises experimentais após os procedimentos.

Fonte: Acervo INTO.

Procuramos, também, elaborar o cálculo amostral com base em estudos anteriores do grupo, ou mesmo em estudos que analisem o mesmo desfecho de interesse. A título de exemplo, em estudo do nosso grupo para estabelecimento de tumores derivados de pacientes e posterior análise de marcadores de resistência quimioterápica, consideramos o desfecho de crescimento tumoral. Segundo a experiência prévia do grupo (MEOHAS *et al.*, 2019; FORTUNA-COSTA *et al.*, 2020), cerca de 40% das amostras de osteossarcoma enxertadas em camundongos se desenvolvem no animal. Assim, esses tumores podem ser repassados a novos animais. Para conseguirmos dez amostras para as análises subsequentes (expressão proteica e expressão gênica), calculamos a necessidade de coletar 25 amostras parentais de osteossarcoma e enxertar em 50 animais (2 animais com fragmentos do mesmo paciente) com taxa de sucesso de 40% (Figura 7).

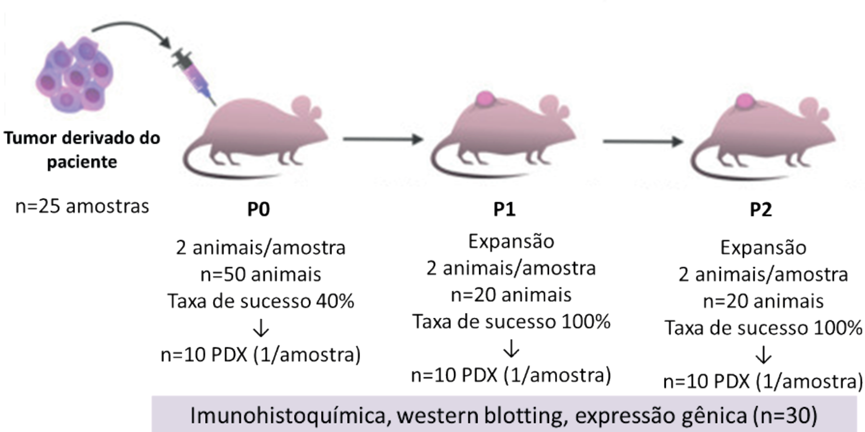


Figura 7. Exemplo de planejamento experimental e cálculo amostral para estabelecimento de modelo de tumor derivado de paciente (PDX).

Fonte: Acervo INTO.

Em outro estudo, em que pretendemos avaliar a regeneração óssea de um novo biomaterial em modelo de defeito crítico em calvária, consideramos os resultados prévios de um estudo anterior. Desta forma, obtivemos os dados do desfecho principal - volume ósseo sobre volume total do tecido (BV/TV) - e aplicamos os valores de média e desvio padrão dos grupos controle e tratado nesse experimento anterior no site *Overview of Power and Sample Size.com Calculators*[1] para análise de dados quantitativos por ANOVA, e obtivemos o resultado de seis animais por grupo para avaliação do volume ósseo por microtomografia com poder de 80% e erro alpha 0,05 (Figura 8).

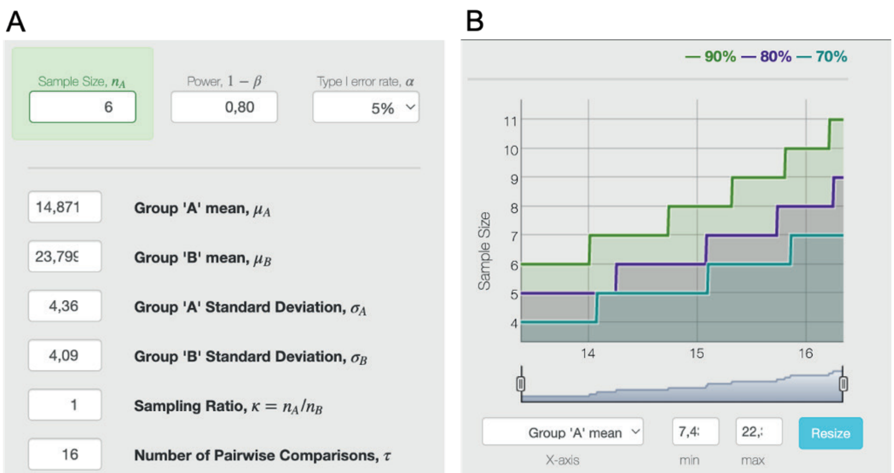


Figura 8. Resultado do cálculo amostral realizado com base em dados anteriores do grupo para o desfecho volume ósseo.

Fonte: *Print* de tela do cálculo amostral realizado no site *Overview of Power and Sample Size.com Calculators.*

Planejamento (Figura 9) e randomização também são fatores que devem ser considerados. Não apenas a randomização de grupos, mas também a randomização das gaiolas/mini-isoladores na estante/rack durante o experimento e para a mensuração de desfechos não terminais. Para tal, o bioterista deve ser orientado e treinado de forma que compreenda a importância dessa prática.

1 http://powerandsamplesize.com/Calculators/

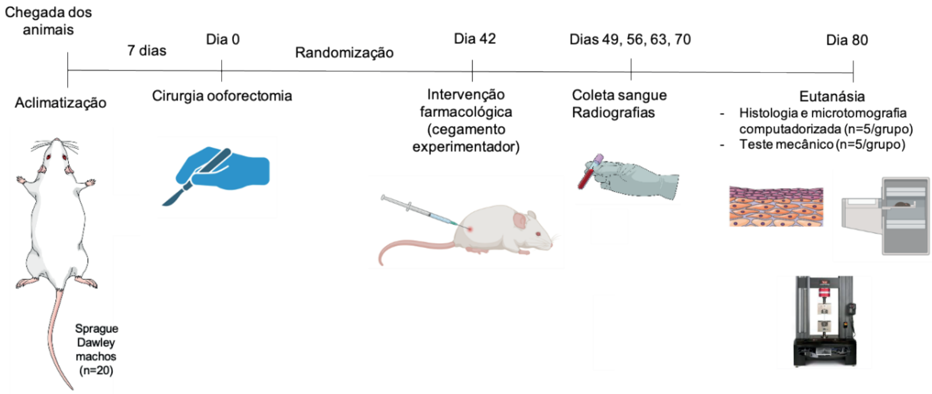


Figura 9. Fluxograma de planejamento de um estudo com ratas ovariectomizadas para teste de fármacos

Fonte: Esquema criado em www.BioRender.com

2.2 Aspectos pré e intraoperatórios

O melhor controle dos aspectos pré e intraoperatórios é o refinamento das técnicas, resultando na minimização do impacto no bem-estar animal. Na nossa prática, buscamos controlar os fatores desde o recebimento dos animais. Ao serem recebidos no INTO, os camundongos são mantidos em grupos de até cinco animais em racks ventiladas com temperatura de 22 ± 2ºC, umidade média de 70% e ciclos de luz de 12 horas dia/noite por um período mínimo de sete dias para adaptação ao ambiente e à rotina do novo biotério. Para ratos, mantemos em estantes ventiladas com até três animais por caixa. Se forem animais com mais de 350g, mantemos em grupos de dois. Enriquecimento ambiental é fornecido aos animais com rolinhos de papelão, palitos de madeira e sementes de girassol.

Todos os procedimentos cirúrgicos são realizados sob anestesia inalatória, iniciados em câmara de indução com concentração alveolar de isoflurano de 4 a 5%. O animal é, então, transferido para máscara facial e a manutenção é realizada com concentração de 2% a 3%. Uma vez na mesa sobre colchão térmico, é realizada analgesia preemptiva associando cetoprofeno e cloridrato de tramadol por via subcutânea ou intraperitoneal - com esquemas que variam dependendo do procedimento. Um lubrificante ocular é aplicado para prevenir a ressecação da córnea do animal. A tricotomia é realizada com creme depilatório por cerca de cinco minutos, o excesso de pelos é removido com gaze umedecida e a pele é limpa com clorexidina 10%. O campo cirúrgico é protegido por plástico estéril - quando possível, deve-se usar plástico transparente para facilitar o monitoramento respiratório (Figura 10).

transparente para facilitar monitoramento respiratório.



Figura 10. Preparo da pele e proteção do campo cirúrgico com plástico estéril

Fonte: Acervo dos autores.

A identificação dos animais é necessária para manutenção dos grupos no período pós-operatório após o tempo de isolamento. Utilizamos o sistema de identificação auricular realizado por meio de furador. A identificação dos animais é feita pelo número da gaiola e número do furo dentro de cada gaiola. Dessa forma, usamos os números 1, 2, 3, 10, 20 e 30 (Figura 11). Assim, por exemplo, os animais da gaiola 10 serão identificados como C10M1, C10M2 etc.



Figura 11. Sistema de identificação dos animais para reagrupamento na mesma gaiola após período de isolamento.

Fonte: Acervo INTO. Esquema criado pelos autores em www.BioRender.com

Ainda no período intraoperatório, o monitoramento da frequência respiratória é um parâmetro da profundidade da anestesia. Assim, realizamos monitoramento e registro dos parâmetros monitorados, conforme discriminado (Quadro 1). A frequência respiratória normal no camundongo é de 80 a 230 respirações por minuto, e a do rato, de 85. A porcentagem de isoflurano é ajustada de acordo com a contagem que deve ser realizada por um auxiliar, e não pelo cirurgião principal, de acordo com o Quadro 1 (EWALD *et al.*, 2011). Para auxiliar o monitoramento durante a cirurgia e anotar dados durante cada procedimento, elaboramos a ficha de monitoramento intraoperatório (ANEXO 1). Idealmente, a saturação de oxigênio deve ser mensurada também servindo como parâmetro de monitoramento, entretanto nem sempre o equipamento está disponível nas unidades experimentais.

Anestesia	**Frequência respiratória**
Ótima	~55-65 respirações por minuto
Plano anestésico muito profundo	<50 respirações por minuto
Plano anestésico muito superficial	>70 respirações por minuto

Quadro 1. Parâmetros para monitoramento intraoperatório da frequência respiratória.

2.3 Aspectos pós-operatórios e critérios de ponto final

Imediatamente após a cirurgia, cada animal é colocado isoladamente em mini-isolador ou gaiola sobre colchão térmico para observação contínua até a recuperação total da anestesia. A presença de comportamentos relevantes para a dor (espasmos, arqueamento das costas, cambalear ou cair e contorcer-se) é observada por 10 minutos após a cirurgia. Também é monitorada a ingestão de alimentos e a atividade locomotora ou exploratória. Em geral, nesse período imediato de observação não há retorno da ingestão de água ou alimentos. As caixas só retornam à estante ou mini-isolador na sala de animais quando o animal estiver totalmente acordado e ativo. Na nossa rotina, os animais são mantidos separados (isolamento social) por cinco dias para evitar arranhões e mordidas na ferida cirúrgica por outros animais. Após cinco dias, são reagrupados respeitando-se os grupamentos anteriores aos procedimentos. No reagrupamento, a continuidade da observação pelo bioterista é essencial para identificar quaisquer brigas.

No período pós-operatório não imediato, o estado de saúde animal é monitorado duas vezes ao dia durante três dias pós-operatórios, e uma vez ao dia depois disso. Os animais são pesados a cada dois ou três dias. Animais com sinais de infecção ou abscesso não intencional, letargia, dor, perda excessiva de peso (>15%) são eutanasiados. Os dados são registrados em fichas de monitoramento pós-operatório (ANEXO 2). Recomendamos

que a ficha contenha todos os espaços e critérios para preenchimento conforme planejado no projeto aprovado pela comissão de ética em um sistema semiquantitativo de avaliação, auxiliando, desta forma, a tomada de decisão para a eutanásia precoce. Nesse sistema, o escore de avaliação 3 para qualquer uma das seguintes observações clínicas: atividade, movimento / marcha, respiração, estado de alerta resulta em eutanásia precoce, bem como a perda de peso corporal igual ou superior a 20%. Para as pontuações de 2 a 3 em todos os parâmetros, é necessário tratamento veterinário imediato. A ficha de monitoramento deve ser mantida sob guarda no biotério para verificação pelo responsável técnico.

Especificamente nos modelos tumorais PDX, os animais serão acompanhados semanalmente por pelo menos seis meses. Ao longo desse período, monitoramos o peso dos animais e o volume tumoral com paquímetro [(maior eixo^2) x menor eixo / 2]. O volume de 1800mm^3 é considerado ponto final humanitário. Quando, após oito meses, não apresentam volume mínimo de 200 mm^3, são considerados como insucesso de enxertia e os animais são submetidos à eutanásia. Os dados são anotados em fichas de monitoramento (ANEXO 3).

CONCLUSÕES

Embora haja muitos avanços no sentido de substituir animais na pesquisa científica, em algumas situações os modelos animais ainda são necessários. No estudo das doenças em traumatologia e ortopedia, muitos modelos são cirúrgicos, portanto, o principal aspecto que pode afetar o bem-estar é a dor. Desta forma, o planejamento pré-operatório, o monitoramento intraoperatório e pós-operatório cuidadosos, associados a um protocolo analgésico multimodal, são imperativos.

REFERÊNCIAS

ALKHAIBARY, A.; ALHARBI, A.; ALNEFAIE, N.; OQALAA ALMUBARAK, A.; ALORAIDI, A.; KHAIRY, S. Cranioplasty: A Comprehensive Review of the History, Materials, Surgical Aspects, and Complications. **World Neurosurgery**, [s. l.], v. 139, p. 445–452, 2020.

ARLETT, C. F. The use of dubious cell lines in research: is trust enough? **The Lancet Oncology**, [s. l.], v. 2, n. 8, p. 467, 2001.

BONUCCI, E.; BALLANTI, P. Osteoporosis-bone remodeling and animal models. **Toxicologic Pathology**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 957–969, 2014.

GILLET, J.-P.; CALCAGNO, A. M.; VARMA, S.; MARINO, M.; GREEN, L. J.; VORA, M. I.; PATEL, C.; ORINA, J. N.; ELISEEVA, T. A.; SINGAL, V.; PADMANABHAN, R.; DAVIDSON, B.; GANAPATHI, R.; SOOD, A. K.; RUEDA, B. R.; AMBUDKAR, S. V.; GOTTESMAN, M. M. Redefining the relevance of established cancer cell lines to the study of mechanisms of clinical anti-cancer drug resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 108, n. 46, p. 18708–18713, 2011.

GLATT, V.; MATTHYS, R. Adjustable stiffness, external fixator for the rat femur osteotomy and segmental bone defect models. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, [s. l.], n. 92, p. e51558, 2014.

GUIMARÃES, J. M.; SCORZA, B. J. B.; PERINI, J. A.; CAVALCANTI, A. S.; DUARTE, M. E. L. Caracterização da membrana induzida pela técnica de Masquelet em modelo murino de defeito ósseo segmentar. **Revista Brasileira de Ortopedia**, xx, xx, 2023. *no prelo.*

HE, C.; SUN, Z.; HOFFMAN, R. M.; YANG, Z.; JIANG, Y.; WANG, L.; HAO, Y. P-Glycoprotein Overexpression Is Associated With Cisplatin Resistance in Human Osteosarcoma. **Anticancer Research**, [s. l.], v. 39, n. 4, p. 1711–1718, 2019.

HIGUCHI, T.; SUGISAWA, N.; MIYAKE, K.; OSHIRO, H.; YAMAMOTO, N.; HAYASHI, K.; KIMURA, H.; MIWA, S.; IGARASHI, K.; KLINE, Z.; BOUVET, M.; SINGH, S. R.; TSUCHIYA, H.; HOFFMAN, R. M. Pioglitazone, an agonist of PPARγ, reverses doxorubicin-resistance in an osteosarcoma patient-derived orthotopic xenograft model by downregulating P-glycoprotein expression. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, [s. l.], v. 118, p. 109356, 2019.

LELOVAS, P. P.; XANTHOS, T. T.; THOMA, S. E.; LYRITIS, G. P.; DONTAS, I. A. The Laboratory Rat as an Animal Model for Osteoporosis Research. **Comparative Medicine**, [s. l.], v. 58, n. 5, p. 424–430, 2008.

LINDSEY, R. W.; GUGALA, Z.; MILNE, E.; SUN, M.; GANNON, F. H.; LATTA, L. L. The efficacy of cylindrical titanium mesh cage for the reconstruction of a critical-size canine segmental femoral diaphyseal defect. **Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society**, [s. l.], v. 24, n. 7, p. 1438–1453, 2006.

MASQUELET, A. C.; BEGUE, T. The concept of induced membrane for reconstruction of long bone defects. **The Orthopedic Clinics of North America**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 27–37; table of contents, 2010.

MCGOVERN, J. A.; GRIFFIN, M.; HUTMACHER, D. W. Animal models for bone tissue engineering and modelling disease. **Disease Models & Mechanisms**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. dmm033084, 2018.

OHEIM, R.; SCHINKE, T.; AMLING, M.; POGODA, P. Can we induce osteoporosis in animals comparable to the human situation? **Injury**, [s. l.], v. 47 Suppl 1, p. S3-9, 2016.

RAY, A.-C.; PHILANDRIANOS, C.; BERTRAND, B.; MÉLOT, A.; ROCHE, P.-H.; JALOUX, C.; CASANOVA, D. Two-stage free flap reconstruction of the scalp and calvaria for large neurosurgical resections. **Microsurgery**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 331–336, 2020.

SAYLES, L. C.; BREESE, M. R.; KOEHNE, A. L.; LEUNG, S. G.; LEE, A. G.; LIU, H.-Y.; SPILLINGER, A.; SHAH, A. T.; TANASA, B.; STRAESSLER, K.; HAZARD, F. K.; SPUNT, S. L.; MARINA, N.; KIM, G. E.; CHO, S.-J.; AVEDIAN, R. S.; MOHLER, D. G.; KIM, M.-O.; DUBOIS, S. G.; HAWKINS, D. S.; SWEET-CORDERO, E. A. Genome-Informed Targeted Therapy for Osteosarcoma. **Cancer Discovery**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 46–63, 2019.

SENOS, R.; HANKENSON, K. D. Calvaria critical-size defects in rats using piezoelectric equipment: a comparison with the classic trephine. **Injury**, [s. l.], v. 51, n. 7, p. 1509–1514, 2020.

SITTITAVORNWONG, S.; MORLANDT, A. B. P. Reconstruction of the scalp, calvarium, and frontal sinus. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 105–129, 2013.

TENTLER, J. J.; TAN, A. C.; WEEKES, C. D.; JIMENO, A.; LEONG, S.; PITTS, T. M.; ARCAROLI, J. J.; MESSERSMITH, W. A.; ECKHARDT, S. G. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. **Nature Reviews. Clinical Oncology**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 338–350, 2012.

TIAN, T.; ZHANG, T.; LIN, Y.; CAI, X. Vascularization in Craniofacial Bone Tissue Engineering. **Journal of Dental Research**, [s. l.], v. 97, n. 9, p. 969–976, 2018.

TOMÉ-BERMEJO, F.; PIÑERA, A. R.; ALVAREZ-GALOVICH, L. Osteoporosis and the Management of Spinal Degenerative Disease (I). **The Archives of Bone and Joint Surgery**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 272–282, 2017.

TZIOUPIS, C.; GIANNOUDIS, P. V. Prevalence of long-bone non-unions. **Injury**, [s. l.], v. 38 Suppl 2, p. S3-9, 2007.

ESTUDOS DE INDUÇÃO DE CÂNCER

Data de aceite: 03/07/2023

Tays Freitas Martins Bento
Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, RJ
ORCID 0000-0003-2864-701X

Renata Batista da Silva
Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, RJ
ORCID 0009-0002-9915-5733

1 | ESTUDOS DE INDUÇÃO DE CÂNCER EM ANIMAIS EXPERIMENTAIS

A utilização de animais em experimentos contribui notoriamente para o avanço do conhecimento acerca do mecanismo de doenças e respectivos tratamentos. Novas descobertas permitem o aprimoramento de intervenções clínicas, com vistas a preservar a saúde do ser humano.

Um dos grandes desafios atuais para que experimentos utilizando animais sejam bem-sucedidos envolve a necessidade de planejamento rigoroso, que se inicia com a escolha correta do modelo animal, passando pelos cuidados para que o experimento transcorra em respeito aos princípios éticos e de bem-estar animal, além de um desenho experimental adequado. Dessa forma, aumentam-se as chances de que os dados gerados com os experimentos sejam fidedignos e reprodutíveis, e que a vida dos animais utilizados não seja desperdiçada (SINGH *et al.*, 2016).

A inoculação de células tumorais em roedores, principalmente camundongos, é um procedimento experimental amplamente utilizado com os objetivos de propagar uma linhagem tumoral e estudar diferentes tipos de câncer, assim como seus respetivos tratamentos. Apesar dos conflitos éticos envolvidos na utilização de animais em pesquisas, uma das grandes desvantagens do cultivo celular, frente aos modelos animais, é que no primeiro não é possível reproduzir situações de metástase e angiogênese tumoral (DE-SOUZA, 2018).

Tumores podem ser induzidos experimentalmente de forma ortotópica,

ou seja, no tecido ou local de sua formação, ou de forma ectópica, geralmente por via subcutânea, intravenosa ou intraperitoneal. Em alguns casos, é necessário alterar o estado imunológico ou fisiológico do animal para realizar o enxerto de algumas linhagens tumorais, por meio de técnicas como a irradiação a baixo nível ou a utilização de agentes imunossupressores. Sendo assim, os camundongos imunodeficientes são os mais utilizados para esses experimentos. Também é possível utilizar linhagens de camundongos geneticamente modificadas, desenvolvidas por meio do conhecimento a respeito dos fatores genéticos envolvidos no desenvolvimento da doença. Outra possibilidade é a indução química de tumores, através da inoculação de substâncias potencialmente carcinogênicas.

Outro fator a ser considerado é o de que camundongos podem desenvolver de forma espontânea alguns tumores, tornando necessário o conhecimento prévio sobre a incidência destes, a fim de que o bem-estar animal seja assegurado.

2 | PLANEJAMENTO DO EXPERIMENTO

Experimentos envolvendo animais causam dor e distresse, sendo de extrema importância minimizá-los, pois esses fatores influenciam diretamente o bem-estar animal, que deve ser assegurado em todas as fases dos experimentos, de acordo com os princípios dos 3Rs (redução, refinamento e substituição), introduzidos por Russel & Burch em 1959. Além disso, dor e distresse também podem afetar de forma negativa os resultados experimentais (SILVA-REIS *et al.*, 2021).

Estudo publicado revelou que apenas 29% dos artigos analisados que relatavam procedimentos cirúrgicos em animais mencionavam o uso de anestésicos, subestimando a dor nos animais. Existe um certo medo, não racionalizado, por parte dos pesquisadores, em utilizar analgésicos durante os experimentos, com a ideia de que eles podem confundir ou interferir na interpretação dos resultados. Entretanto, o não tratamento da dor leva à imunossupressão e, consequentemente, à interpretação equivocada de resultados (PETERSON; NUNAMAKER; TURNER, 2017).

Vale ressaltar que a não previsão de analgesia nos procedimentos considerados invasivos deve ser fundamentada em projeto, e previamente analisada e aprovada pela CEUA.

A fim de minimizar dor e distresse experimentais, um planejamento analgésico e anestésico deve ser estabelecido, bem como a oferta de condições que favoreçam o bem-estar animal.

Alguns pontos devem ser levados em consideração, como:

- O preparo e a aclimatação dos animais antes do início dos experimentos;
- a oferta, em sistema de rodízio, de itens de enriquecimento ambiental com o objetivo de reduzir o distresse experimental;
- os procedimentos prévios à inoculação de células tumorais como, por exemplo,

a necessidade de depleção medular por meio de irradiação, para casos de cirurgia de enxerto tumoral;

- a via selecionada para inoculação das células tumorais, a fim de verificar a necessidade de anestesia prévia, com seleção de anestésico e dosagens adequadas, obtidos na literatura de referência ou por meio de guias para cuidados com animais em experimentação;
- o constante monitoramento dos animais com o objetivo de atestar se há a observação de algum comportamento que denote mal-estar – uma vez que experimentos com células tumorais podem levar à dor e morte – e qual conduta deve ser aplicada;
- a avaliação da necessidade de uso de analgésicos, principalmente durante a fase de crescimento tumoral, de forma a minimizar a dor;
- o *endpoint* experimental, isto é, o conjunto de parâmetros que definem o ponto estabelecido como final do experimento, no qual o animal deve ser eutanasiado. Ele pode se dar antes mesmo de atingido o objetivo do estudo, a fim de cessar a dor e o mal-estar animal.

3 | AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS EM EXPERIMENTAÇÃO PARA ESTUDOS EM CÂNCER

Modelos animais são importantes ferramentas para estudos do desenvolvimento e patogênese de diferentes tipos de tumores, bem como para a avaliação de possíveis fatores de risco, agentes preventivos e tratamentos. Visto que o aparecimento de muitos tumores se deve à associação de fatores genéticos e ambientais, faz-se necessário avaliar as vantagens e desvantagens do uso de cada modelo animal, a fim de que os resultados obtidos sejam representativos daqueles encontrados em humanos (DE-SOUZA; COSTA-CASAGRANDE, 2018).

Em concordância com os princípios éticos, recomenda-se que animais sejam utilizados em estudos apenas após esgotados os ensaios utilizando linhagens celulares *in vitro*, e sob cuidados permanentes que apoiem o bem-estar animal.

A avaliação dos animais utilizados nos estudos de câncer se dá pelo constante monitoramento de sinais que indiquem dor e sofrimento, e esses sinais podem variar de acordo com o tipo de câncer estudado.

Conforme dito anteriormente, a dor e o sofrimento infligidos a animais de laboratório, além de serem eticamente inaceitáveis, podem constituir uma fonte potencial de erros nos resultados do experimento, uma vez que são capazes de alterar vários parâmetros fisiológicos, dentre eles concentrações séricas ou plasmáticas de corticosteroides, glicose, hormônios de crescimento ou prolactina, frequência cardíaca ou pressão arterial (FAUSTINO-ROCHA *et al.*, 2019). Portanto, um monitoramento frequente dos animais em estudo possibilita não somente que os princípios éticos e o bem-estar animal sejam

respeitados, como favorece a obtenção de resultados fidedignos para o estudo proposto.

3.1 Tipos de tumores

Há três tipos de tumores que são estudados na experimentação animal:

- Tumores não visíveis: a perda de peso, geralmente considerada entre 10 e 20%, é utilizada como parâmetro para definir o *endpoint* em estudos com animais, apesar de não ser considerada como ideal para monitorar o bem-estar animal em pesquisas que envolvam o crescimento de tumores internos, não mensuráveis, já que o aumento da massa tumoral, assim como a desidratação, podem mascarar o déficit no estado geral – e, consequentemente, do peso – no animal em experimentação (PASTER; VILLINES; RICKMAN, 2009).
- Tumores cavitários e do sistema nervoso: tornam-se um desafio à parte, pois somente exames de imagem podem dimensioná-los, para que um *endpoint* adequado seja estabelecido. Nesses casos, a perda de peso e a aparência geral dos animais podem ser os únicos fatores prontamente disponíveis para se definir o *endpoint* experimental. As leucemias, mielomas, linfomas são exemplos de cânceres que não formam tumores sólidos e, portanto, o monitoramento do comportamento e da condição geral do animal deve ser realizado com frequência e de forma minuciosa, a fim de que o sofrimento animal não seja estendido.
- Tumores subcutâneos: os parâmetros para avaliação de *endpoint* incluem medição regular do tamanho do tumor, realizado geralmente por paquímetro, avaliação de presença de ulceração/necrose do tumor, perda de peso e inapetência, alterações na mobilidade e no comportamento fisiológico considerado normal para a espécie.

3.2 Checklist para observação de sinais clínicos e comportamento animal

A maioria dos parâmetros analisados para se constatar dor ou mal-estar em um animal são os mesmos para diferentes tipos de estudos, e englobam aspectos de aparência geral, do comportamento e de sinais clínicos.

No que concerne à aparência geral do animal, avaliam-se, durante o período de experimento (adaptado de FAUSTINO-ROCHA *et al*., 2019):

1. Peso;
2. condição (ou escore) corporal;
3. ingestão de água e alimentos;
4. postura;
5. avaliação de mucosas, pele e pelos;

6. aspecto dos olhos;
7. posicionamento de orelhas e vibrissas;
8. aspecto das fezes.

A avaliação comportamental do animal envolve:

1. Resposta a estímulos sonoros;
2. atividade do animal, como movimento de exploração dentro da gaiola, de pular e se pendurar, além do hábito de lamber pelos.

Os sinais clínicos analisados abrangem:

1. Aferição da temperatura corporal;
2. medição de batimentos cardíacos;
3. medição da frequência respiratória;
4. grau de hidratação;
5. valor de hematócrito e densidade urinária.

Nem todo biotério de experimentação possui os instrumentos e equipamentos necessários a uma avaliação criteriosa de todos os parâmetros elencados acima. Portanto, é necessário um profundo conhecimento sobre o comportamento e a fisiologia considerados normais para a espécie envolvida, e que o monitoramento abranja o máximo possível de parâmetros que avaliem dor e sofrimento, dentro da realidade da instituição, e seja executado com frequência - podendo esta ser diária para estudos em câncer.

Como fonte de referência para identificação de sinais de sofrimento, é recomendável a utilização de escalas de dor, como a *Grimace Scales*, do Centro de Referência para Substituição, Refinamento e Redução de Animais em Pesquisa (NC3R, Londres), além de Guias e Diretrizes internacionais com informações sobre parâmetros fisiológicos e comportamentais. Alguns desses Guias apresentam parâmetros específicos para avaliação de tumores, como será visto adiante.

4 | ORIENTAÇÕES PARA TOMADA DE DECISÃO EM EXPERIMENTOS COM CÂNCER

Os experimentos com câncer em animais de laboratório exigem o acompanhamento frequente para avaliação clínica e de desconforto e/ou dor que comprometem o bem-estar animal. Dessa forma, parâmetros comportamentais e fisiológicos, além do tamanho e aspecto do tumor, devem ser monitorados e classificados quanto ao grau de comprometimento para a tomada de decisão, seja para a administração de analgésicos ou realização da eutanásia, a fim de interromper o mal-estar. Alguns países elaboraram guias para auxiliar na avaliação e classificação dos tumores, como é o caso do Guia do Conselho Canadense de Cuidados Animais (CCAC, 1998).

Esse guia recomenda que o *endpoint* seja estabelecido antes de o animal estar em estado moribundo, o qual ocorre após o mal-estar e antecede a morte, não respondendo a estímulos, apresentando problemas respiratórios e prostração. Para isso, a observação do animal deve considerar cinco aspectos, utilizando classificação de 0 (normal) a 3 (grave) para cada uma delas:

- Mudanças no peso corporal (redução na ingestão de água e alimento);
- aparência física externa;
- sinais clínicos mensuráveis (frequências cardíaca e respiratória);
- mudanças de comportamento;
- resposta comportamental a estímulos externos.

Os *endpoints* para câncer são:

- O tamanho da massa do tumor começa a comprometer a mobilidade, as funções normais ou causar dor devido à sua localização;
- perda de peso superior a 20% do peso corporal de um animal normal;
- presença de ulceração ou infecção no local do tumor;
- invasão dos tecidos vizinhos por um tumor localizado;
- ocorrência de trauma autoinduzido no local;
- tumor com 5% do peso corporal para experimento de rotina e tumor com 10% do peso corporal para experimentos terapêuticos;
- perda de peso por 6 dias consecutivos.

As recomendações acerca do monitoramento dos animais preconizam que a avaliação seja realizada por pessoa com conhecimento sobre o comportamento animal da espécie estudada, que a avaliação tenha duração e frequência suficientes para detectar o quanto antes sinais de dor e mal-estar e que o registro do monitoramento e avaliação dos animais seja acessível a todas as pessoas envolvidas com o experimento e com o cuidado animal. Segundo o Guia australiano para Cuidados de Animais com Fins Científicos (2021), deve-se considerar:

1. Os impactos adversos do desenvolvimento e biologia do tumor (taxa de crescimento, capacidade de invasão, potencial para ulceração e/ou metástases e caquexia), efeitos de agentes terapêuticos, imunoterapia e complicações cirúrgicas.
2. O local de implantação ou método de indução do tumor, evitando a planta do pé, cauda, cérebro e olhos, exceto na ausência de alternativa válida.
3. A morte por tumor nunca deve ser um *endpoint*.
4. Sinais de dor, redução do *score* corporal, crescimento do tumor, ulceração do tumor, invasão, metástases e efeitos tóxicos de agentes terapêuticos.

A Avaliação do escore corporal deve ser sempre um indicador de bem-estar nos experimentos, conforme já mencionado no capítulo 5. Porém, além da condição corporal, deve-se considerar:

- A velocidade da perda de peso e se ela é progressiva;
- anorexia, falta de ingestão hídrica;
- desidratação;
- diarreia;
- pelo áspero;
- postura encurvada ou perda de reflexo de endireitamento;
- dificuldade respiratória (dispneia);
- paresia ou paralisia;
- condições que comprometam a locomoção e atividades normais do animal;
- tumor superior a 10% do peso corporal;
- tumor com 20 mm em qualquer dimensão;
- tumor ulcerado;
- tumores que prejudicam a alimentação ou a locomoção.

4.1 Diretrizes para o bem-estar e uso de animais na pesquisa do câncer

O Guia britânico *Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research* (2010) é específico para estudos de câncer, sendo o mais completo em informações sobre o tema. Dentre as recomendações, o *endpoint* para estudos de tumorigenicidade pode ser o momento em que o crescimento progressivo do tumor é detectado. Já para o estudo da fase maligna de papilomas cutâneos, necessita-se de técnicas de imagem para a definição de *endpoints.*

O Guia faz as seguintes proposições:

- Não deve ser aceita a condição de moribundo do animal;
- as vias de inoculações como coxim plantar, cauda, via retro orbitar ou intraóssea requerem uma justificativa plausível para a indução de tumores;
- o limite da carga tumoral deve ser o mínimo necessário para confirmar um resultado científico;
- nos estudos terapêuticos, deve-se evitar que os tumores de controle se tornem excessivamente grandes.

Os seguintes pontos finais podem ser estabelecidos:

- Limite do tamanho do tumor: 12 mm para camundongo e 25 mm para rato (estudos terapêuticos: 15 mm para camundongo e 28 mm para rato);
- impossibilidade de ingestão alimentar ou hídrica - comer ou beber água por 24 horas;
- perda de peso de 20% do peso corporal inicial;
- perda de peso de 15% em 72 horas;
- hipotermia persistente;
- secreções com sangue ou mucopurulentas;
- dificuldade respiratória (dispneia) ou cianose;
- nódulos linfáticos ou baço aumentados;
- paresia ou paralisia;
- distensão abdominal significativa ou ascite (limite: 20% acima da circunferência abdominal de um camundongo controle);
- diarreia por período superior a 48 horas;
- tumores que comprometem a locomoção e outras atividades ou causam vocalização anormal.

4.2 A avaliação do monitoramento do bem-estar animal em pesquisas com indução de tumor

Recomenda-se a avaliação clínica e o monitoramento do bem-estar animal em pesquisas com indução de tumor, através da verificação de: expressão facial, perda de peso corporal e crescimento progressivo do tumor. As pesquisas também discorrem sobre a necessidade da utilização de técnicas de imagem para monitorar o crescimento e a disseminação de metástases. Além disso, deve-se considerar o local de implante ou método de indução do tumor, sua biologia, o potencial para lesões e desenvolvimento de metástases, sendo imprescindível o estabelecimento do *endpoint* mais antecipado possível.

Apesar da Resolução Normativa nº 33, de 18/11/2016, que versava sobre o tema e possuía proposições para essa avaliação, essa foi revogada pela RN 57 de 06/12/2022, no entanto a nova resolução não menciona nenhum tipo de orientação a respeito.

1. Classificação do tamanho e aspecto do tumor



Figura 1: Tumor pequeno sem lesão.

Fonte: Acervo INCA, 2021.

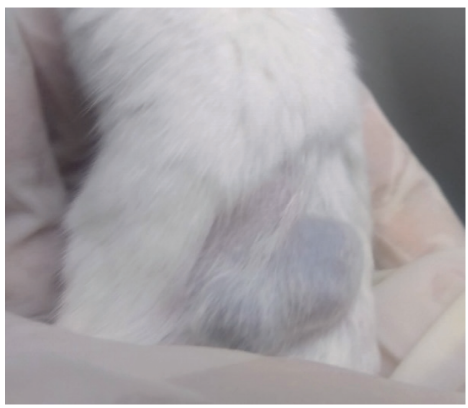


Figura 2: Tumor médio sem lesão.

Fonte: Acervo INCA, 2021.



Figura 3: Tumor médio com ulceração.

Fonte: Acervo INCA, 2021.



Figura 4: Tumor grande inflamado.

Fonte: Acervo INCA, 2021.



Figura 5: Tumor grande muito inflamado, ulcerado e com pontos de necrose. Fonte: arquivo pessoal.

Fonte: Acervo INCA, 2021.



Figura 6: Tumor necrosado.

Fonte: Acervo INCA, 2021.

Aspecto do tumor	Escore
Sem lesão	0
Inflamado	1
Lesões cutâneas superficiais	2
Ulceração sem necrose	3
Ulceração com necrose	4
Grandes ulcerações com ou sem necrose	5

Quadro 1: Classificação de aspecto do tumor subcutâneo

Fonte: Adaptado do procedimento operacional padrão (POP) n. 415.3 – Pontos finais humanitários para roedores utilizados como modelos de câncer – McGrill University, 2018.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de o modelo animal ser essencial para os estudos em câncer, existe ainda um grande déficit em traduzir os efeitos da doença em animais, devido ao complexo processo desencadeado na carcinogênese, além de diferenças na fisiologia e progressão da doença como se apresenta em humanos. Tais diferenças, bem como variações na homologia de alvos moleculares entre camundongos e humanos, podem levar a limitações de tradução. Mesmo que os modelos animais continuem sendo uma fonte única de informações *in vivo*, métodos alternativos podem eventualmente substituir a ligação entre os estudos *in vitro* e as aplicações clínicas (MAK; EVANIEW; GHERT, 2014).

Em algumas circunstâncias, ensaios-piloto utilizando um pequeno número de animais podem ser necessários para determinar o início e o progresso dos efeitos adversos que denotem dor e mal-estar aos animais e para identificar os critérios de desfecho humano (NC3RS, 2021).

Há de se considerar que o uso de animais é fruto de discussões éticas há muitos anos e que, apesar de continuar sendo realizado, existe uma preocupação pública com o bem-estar e a validação científica das pesquisas conduzidas com animais. Portanto, a definição de *endpoints* com o objetivo de que os princípios dos 3Rs de Russel & Burch sejam implementados é essencial e, sempre que possível, diretrizes específicas para modelos toxicológicos, de câncer, doenças infecciosas, entre outros, devem ser aplicadas aos modelos utilizados (SILVA-REIS *et al*., 2021).

REFERÊNCIAS

BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). **Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica**: fascículo 2: roedores e lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, 2019. Capítulo 10, p. 111-115.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. **Guidelines on:** Choosing an appropriate endpoint in experiments using animals for research, teaching and testing. Ottawa, Canadá, 1998.Disponível em: http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate_endpoint.pdf.

DE-SOUZA, A. S. C; COSTA-CASAGRANDE, T. A. Modelos Animais de Carcinogênese Colorretal. **ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva** (Artigo de revisão) 2018;31(2): e1369.

FAUSTINO-ROCHA, A. I.; GINJA, M.; FERREIRA, R.; OLIVEIRA, P. A. Studying humane endpoints in a rat model of mammary carcinogenesis. **Iran J Basic Med Sci**. 2019; 22(6):643-649.

GRIMACE SCALES. NC3RS. **National Center for the Replacement, Refinement & Reduction for Animals in Research**. Disponível em https://nc3rs.org.uk/grimacescales. Acesso em 07 de dezembro de 2021.

HUMANE ENDPOINTS. NC3RS. **National Center for the Replacement, Refinement & Reduction for Animals in Research**. Disponível em: https://nc3rs.org.uk/humane-endpoints. Acesso em 08 de dezembro de 2021.

HUMANE INTERVENTION POINTS FOR RODENT CANCER MODELS. McGill University. Standard Operation Procedure #415. SOP 415.03. Canada, 2018. Disponível em: https://www.mcgill.ca/research/files/research/415-_humane_intervention_points_for_rodent_cancer_models_-_oct_2018.pdf. Acesso em 01 de março de 2023.

MAK, I. W.; EVANIEW, N.; GHERT, M. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. **American Journal of Translational Research**. 2014;6(2):114-118.

NATIONAL HEALTH AND MEDICAL RESEARCH COUNCIL. 2021. **Australian code for the care and use of animals for scientific purposes**. 8. ed. Canberra: National Health and Medical Research Council.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **Animal Research Advisory Committee (ARAC) guidelines**. 2019. Guidelines for Endpoints in Animal Study Proposals. Disponível em: https://oacu.oir.nih.gov/system/files/media/file/2021-02/b13_endpoints_guidelines.pdf.

PASTER, E. V.; VILLINES, K. A.; HICKMAN, D. L. Endpoints for mouse abdominal tumor models: refinement of current criteria. **Comparative Medicine**. 2009; 59(3):234-241.

PETERSON, N. C.; NUNAMAKER, E. A.; TURNER, P. V. To Treat or Not to Treat: The Effects of Pain on Experimental Parameters. **Comp Med**. 2017; 67(6):469-482.

SILVA-REIS, R.; FAUTINO-ROCHA, A. I.; GONÇALVES, M.; RIBEIRO, C. C.; FERREIRA, T.; RIBEIRO-SILVA, C.; GONÇALVES, L.; ANTUNES, L.; VENÂNCIO, C.; FERREIRA, R.; GAMA, A.; OLIVEIRA, P. A. Refinement of Animal Model of Colorectal Carcinogenesis through the Definition of Novel Humane Endpoints. **Animals** (Basel). 2021; 11(4):985.

SINGH, V. P.; PRATAP, K.; SINHA, J.; DESIRAJU, K.; BAHAL, D.; KUKRETI, R. Critical evaluation of challenges and future use of animals in experimentation for biomedical research. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**. 2016;29(4):551-561.

WORKMAN, P.; ABOAGYE, E. O.; BALKWILL, F.; BALMAIN, A.; BRUDER, G.; CHAPLIN, D. J; DOUBLE, J. A.; EVERITT, J.; FARNINGHAM, D. A. H.; GLENNIE, M. J.; KELLAND, L. R.; ROBINSON, V.; STRATFORD, I. J.; TOZER, G. M.; WATSON SWEDGE, S. R.; ECCLES, S. A, & An ad hoc committee of the National Cancer Research Institute. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. **British Journal of Cancer**. 2010; 102, 1555–1577.

ESTUDOS DE IRRADIAÇÃO

Data de aceite: 03/07/2023

Jackline de Paula Ayres da Silva
Laboratório de Medicina Experimental e Saúde, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz,
Rio de Janeiro/RJ
ORCID 0000-0003-2225-7723

Monique Ribeiro de Lima
Centro de Experimentação Animal, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz,
Rio de Janeiro/RJ
ORCID 0009-0008-8745-9522

Daiani Cotrim de Paiva Campbell
Centro de Experimentação Animal, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz,
Rio de Janeiro/RJ
ORCID 0000-0003-0699-204X

1 | USO DE MODELOS ANIMAIS EM ESTUDOS DE IRRADIAÇÃO

Os estudos de irradiação começaram na década de 1950 devido à necessidade de tratamento às pessoas que foram atingidas pela irradiação produzida pelas bombas nucleares em Hiroshima e Nagasaki. Desde então, muitas pesquisas estão sendo realizadas a fim de se estudar os efeitos da irradiação em diferentes órgãos, sendo o transplante de medula óssea (TMO) um dos principais alvos de estudo. O TMO consiste na infusão de células-tronco hematopoiéticas provenientes de um doador, que pode ser autólogo ou heterólogo, logo após a depleção da medula óssea doente através de tratamentos citorredutores, tais como a quimioterapia e a radiação. O primeiro TMO clínico foi realizado em 1957, por Donnall Thomas, que administrou a seis pacientes células hematopoiéticas extraídas da medula óssea de cadáveres adultos e fetais, para o tratamento de neoplasias, em especial as hematológicas. Até os dias atuais, continua sendo o procedimento mais utilizado para o tratamento das neoplasias hematológicas, tais como leucemias e linfomas (DURAN-STRUUCK; DYSKO, 2009).

Desde a década de 1950, inúmeros biomodelos estão sendo utilizados para a pesquisa dos mecanismos envolvendo o

TMO, que versam desde os conceitos-chaves sobre hematopoiese, envolvendo composição dos nichos medulares, bem como os mecanismos de tolerância à rejeição ao transplante, um novo e importante campo de pesquisa que desdobrou desses estudos iniciais. Um fenômeno muito comum após a ablação das células hematopoiéticas com quimioterapia ou radioterapia, seguida da injeção de células-tronco hematopoiéticas, é a apresentação de reações sistêmicas de rejeição, chamada de doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH, do inglês: *graft-versus-host disease* - GVHD) (HILL; FERRARA, 2000; COPELAN, 2006). A DECH é definida como uma resposta imune acentuada e estimulada pelo dano tecidual resultante da quimioterapia ou radioterapia pré-transplante, porém muito importante para a cura do paciente, pois níveis baixos dessa reação são importantes no reconhecimento e ativação de morte das células neoplásicas, garantindo o sucesso do TMO e cura do paciente. Essa ideia de destruição do tumor pelo próprio sistema imune foi originalmente explorada por Burnet (1970). Entretanto, reações exacerbadas causam DECH e, devido a esse tênue balanço, esse modelo virou alvo de muitos estudos em diferentes biomodelos, entre eles roedores, canídeos, lagomorfos e primatas (REKERS, 1948 e 1950; LORENZ *et al*., 1951; OSSETROVA *et al*., 2014).

Com relação à sensibilidade à radiação das diferentes linhagens de camundongos, BALB/C e CBA/J são as mais sensíveis, tolerando cerca de 8Gy em irradiação de dose única (*total body irradiation* – TBI) (CUI *et al*., 2002). As linhagens murinas mais resistentes à radiação são 129/J, MA/J, SJL/J, ST/J e P/J (RODERICK, 1963; YUHAS; STORER, 1969). Entretanto, foi observado que algumas dessas linhagens sofrem influência da sazonalidade, com menor resistência à radiação durante o verão, quando a sobrevida chega a reduzir para cerca da metade do tempo esperado para o período de inverno (RODERICK, 1963). A Tabela 1 resume a taxa de sobrevivência de diferentes linhagens frente a irradiação diária de 1Gy.

Dentre as linhagens mais empregadas na experimentação animal, a C57Bl/6 e o C3H/HeN são mais tolerantes que o BALB/C, e as linhagens derivadas de cruzamentos heterólogos são ainda mais resistentes, e costumam ser muito utilizadas em modelos de DECH, como a B6D2F1, que chega a tolerar 15Gy de TBI (REDDY *et al*., 2008). O C3H/HeN não é muito sensível à radiação de dose única, entretanto, quando irradiado com um regime de condicionamento de baixa dose fracionada, passa a ser susceptível (CUI *et al*., 2002).

Um outro tipo de condicionamento utilizado para o TMO é a utilização de radiação fracionada, que, em comparação à radiação de dose única, induz menos lesão e parece ser mais efetiva no tratamento de tumores sólidos, enquanto a radiação de dose única parece ser mais eficaz para o tratamento de leucemias (BUCHALI *et al*., 2000). Pesquisadores realizaram trabalhos nos quais observaram o melhor tempo de intervalo entre as irradiações durante o regime de condicionamento. Os resultados mostraram que duas doses iguais de 6Gy ou 6,5Gy, com intervalo de 4h, produziram menor mortalidade e melhor pega da medula

óssea enxertada quando comparadas ao regime de dose única, utilizando camundongos C57BL/6 e C3H/HeN. Entretanto, não foi observada diferença significativa nos TMO quando foi utilizado o regime de condicionamento de radiação de dose única de 9,5Gy ou duas doses fracionadas de 5, 5,5, 6, 6,5 ou 7Gy (KUSHIDA *et al.*, 2001; CUI *et al.*, 2002).

Outras possibilidades de regimes de condicionamento foram testadas, e resultados promissores também foram obtidos quando o fracionamento foi realizado em 3 doses de 2,5Gy durante o intervalo de 24h em camundongos BALB/c (PIERCE *et al.*, 1985). O mesmo regime de condicionamento também tem se mostrado eficaz no tratamento em humanos, e o fracionamento tem permitido a utilização de doses maiores de irradiação (8-10Gy) como forma de aumentar a sobrevivência dos pacientes e diminuir a chance de recaídas (MORGAN *et al.*, 1996; BUCHALI *et al.*, 2000).

2 | SÍNDROME AGUDA DA RADIAÇÃO

A irradiação possui duas principais funções antes do transplante de medula óssea (TMO): imunossupressão do organismo receptor e eliminação das células neoplásicas. Uma ação direta da irradiação é a lesão das membranas celulares e do material genético, ativando o mecanismo de morte programada. A lesão de várias células concomitantemente gera um acúmulo de debris, proteínas e moléculas que sobrecarregam os sistemas de depuração do corpo. O balanço entre a dose ideal de irradiação que mate o tumor sem gerar excesso de restos metabólicos é um limite tênue, e, por isso, há um grande esforço para se criar sistemas de monitoramento de modo a mapear, descrever e caracterizar os principais sinais decorrentes da irradiação em animais experimentais e humanos.

A síndrome aguda da irradiação (SAR) é caracterizada pela disfunção multiorgânica progressiva de dois ou mais órgãos após a exposição à radiação ionizante. Essa disfunção leva à expressão de várias sub-síndromes que acometem os diferentes órgãos de maneira e tempo dependentes, em que os principais sistemas afetados são: hematopoiético, gastrointestinal e neurovascular. As lesões no sistema gastrointestinal costumam aparecer primeiramente (2 dias), seguidas dos sintomas hematopoiéticos e neurovasculares, este último após 2 semanas, quando empregada até 4Gy em humanos. Considerando doses de radiação mais altas, a síndrome gastrointestinal e hematopoiética aparecem concomitantemente com o início dos sintomas neurovasculares, a partir de 16 horas em doses entre 6-7Gy. Acima de 12Gy, as três síndromes aparecem simultaneamente, duram cerca de 4 dias e reaparecem em 2 dias, ou seja, 6 dias após a exposição inicial à radiação (WASELENKO *et al.*, 2004).

Em camundongos, o comportamento é bem semelhante, e a presença de diarreia é um dos principais sinais gastrointestinais observados. Algumas outras lesões relatadas após a irradiação em camundongos, principalmente quando realizadas de forma fracionada, são: pneumonia intersticial idiopática, lesão gastrointestinal e formação de catarata tardia

(CUI *et al.*, 2002; NASERIAN *et al.*, 2018).

A gravidade da SAR depende da dose geral, taxa de dose, qualidade da radiação e proporção do corpo que é irradiado. A SAR geralmente progride através de 4 fases clínicas: pródromo, latência, doença e recuperação ou morte. O aumento das doses de radiação causa destruição completa da medula óssea, descamação da camada mucosa do sistema gastrointestinal, queimaduras na pele e colapso dos sistemas neurológico e cardiovascular, resultando em morte (DICARLO *et al.*, 2011)

3 | CONDIÇÕES IDEAIS PARA PESQUISA COM MODELO ANIMAL DE IRRADIAÇÃO

Experimentos com irradiação requerem um cuidado pré e pós-irradiação, que visam assegurar o sucesso experimental. Dessa forma, serão elencadas as condições gerais nos cuidados pré-irradiação, durante e pós-irradiação.

a. Dentre os cuidados pré-irradiação, ressaltam-se:

- Os animais devem ter seu peso e temperatura auferidos assim que chegarem ao biotério de experimentação e, assim, continuarem sendo monitorados até o início do experimento, a fim de que seja determinado o peso inicial e seja estabelecido um padrão de recuperação a ser alcançado nas semanas seguintes.
- Os animais devem ser acondicionados em gaiolas microisoladoras e ventilados individualmente, sendo utilizado filtro HEPA para filtragem do ar. A sala que abriga os animais irradiados deve ser mantida, preferencialmente, em pressão positiva relativa ao corredor, a fim de minimizar a entrada de aerossóis contendo patógenos.
- Os alimentos, água, caixa, maravalha devem ser todos esterilizados e deve-se implementar procedimentos de barreira rigorosos. Os camundongos devem ser livres de patógenos específicos (SPF – *specific pathogen free*) e ser mantidos nessas condições até o final do experimento, como forma de minimizar o risco de infecções.
- As trocas de cama das gaiolas devem ser feitas em estações de fluxo laminar ou cabines de troca, e os manipuladores devem utilizar todos os equipamentos de proteção individual (luva, touca, máscara cirúrgica) a fim de minimizar os riscos de transmissão de patógenos aos animais.
- Os camundongos devem ser tratados com antibiótico que elimine as bactérias *gram* negativas do trato gastrointestinal, tais como *Pseudomonas aeruginosa*, a fim de evitar complicações decorrentes da irradiação, tais como infecções e ulcerações intestinais. O tratamento deve começar na semana que antecede a irradiação, permanecendo por 2 semanas após a irradiação, totalizando 3 semanas de tratamento.

O antibiótico será selecionado pelo investigador em consulta com o médico vete-

rinário do projeto. Dentre as opções de antibióticos, os empregados nesses casos para camundongos são (GOURDON; JIMENEZ, 2014):

1. Enrofloxacina 0,25 a 0,5mg/mL na água de beber.
2. Neomicina 1,1 mg/mL na água de beber.
3. Sulfametoxazol com Trimetoprima em suspensão oral, misturado com água de beber até uma concentração final de 0,65 a 1,6mg/mL (dosagem de 100 a 250mg/kg de peso vivo/24horas).

Obs: importante considerar a quantidade de água por animal. Para camundongos, é considerada a ingestão de 15mL/100g/24horas = 150mL/kg/24h.

• Alguns pesquisadores aconselham acidificar a água (pH 2,5 a 3,0) para impedir o crescimento de bactérias *gram* negativas (DURAN-STRUUCK; DYSKO, 2009).

b. Dentre os cuidados durante a irradiação, ressaltam-se:

- Imediatamente antes da irradiação, caso seja usado um irradiador de pequeno porte, é aconselhável que os animais sejam sedados, a fim de minimizar algum desconforto proveniente do irradiador, caso eles fiquem enclausurados, ou sejam rotacionados durante o processo.
- Fornecer 1ml de fluidos isotônicos estéreis (de preferência aquecidos à temperatura corporal), por via subcutânea, imediatamente antes ou após a irradiação, e repetir após 24 horas.
- Realizar analgesia com drogas de ação central para alívio de dor (exemplo, carprofeno 5mg/kg SC SID).
- Realizar cuidado de ferida na pele (pomada sulfadiaziana de prata).

c. Dentre os cuidados pós-irradiação, ressaltam-se:

- Os cuidados de acondicionamento, manipulação, hidratação e antibioticoterapia já mencionados são mantidos após a irradiação.
- A alimentação deve ser amolecida e oferecida dentro da caixa, bem como a água também poderá ser ofertada em formato gelatinizado, pois os animais ficam debilitados nos primeiros dias após o transplante e sentem dificuldade em se deslocar e de se alimentar quando rações endurecidas tradicionais são utilizadas.
- Os animais devem ser monitorados diariamente, através de ficha contendo os parâmetros para avaliação clínica e comportamental, que serão mencionados na seção a seguir. Nos primeiros 15 dias após a irradiação, é importante que o monitoramento seja feito duas vezes ao dia, devido ao grau de invasividade do procedimento de radiação e o tempo necessário para a recuperação do animal,

caso esse esteja participando de um protocolo de TMO ou DECH.

4 | PONTO FINAL HUMANITÁRIO EM MODELOS PARA IRRADIAÇÃO

O ponto final humanitário dos estudos experimentais é necessário para garantir o bem-estar animal, e vários critérios de intervenção vêm sendo utilizados como forma de minimizar o distresse, a dor e sofrimento animal. Nesse sentido, cada vez mais tem-se tentado sistematizar e quantificar elementos subjetivos como dor e sofrimento de forma a mensurar os sinais objetivos que os expressem, tais como tamanho da abertura do olho, curvatura corporal, bem como o treinamento da equipe envolvida em identificar essas alterações.

Historicamente, os modelos de irradiação usavam a DL50 (a dose na qual cinquenta por cento morrerão em trinta dias), a morte e o estado moribundo do animal como ponto final humanitário a fim de determinar a eficácia da dose em questão, mas atualmente outros critérios são considerados para a realização do ponto final humanitário antes mesmo do aparecimento de sinais de dor e desconforto do animal (NUNAMAKER *et al.*, 2013).

Uma das primeiras sugestões de monitoramento dos animais foi desenvolvida por Cooke e colaboradores (1996) e tinha como proposta o rastreamento dos seguintes parâmetros clínicos: perda de peso, postura, atividade, textura do pelo e integridade da pele. Vários outros sistemas de monitoramento foram propostos desde então, utilizando modelos experimentais em roedores, tais como estudos de distresse, câncer e da experiência adquirida na observação do comportamento de roedores após a irradiação, mas foi Nunamaker e colaboradores (2013) que aprimoraram as tabelas existentes para o modelo de irradiação e denominaram de sistema de pontuação observacional na gaiola (*Cageside Observational Scoring System*). Nessa proposta, a observação do comportamento dos animais é feita através da manutenção dos animais dentro das gaiolas sem que elas sejam abertas. Os critérios como postura, aparência dos olhos e nível de atividade foram observados e receberam uma pontuação de 0 a 3 para cada um desses critérios, sendo 0 considerado o comportamento usual/normal do animal e 3 o comportamento mais atípico.

Outra proposta de pontuação foi denominada de Sistema de Pontuação de Intervenção Murina (*Mouse Intervention Scoring System* - MISS), sendo um sistema de monitoramento individual, o que torna as medidas de intervenção precoces e rápidas. Esse sistema passou por fases de aprimoramento e encontra-se na versão 3 (MISS 3), e, além de avaliar os sinais clínicos, também estabelece os critérios de prognóstico e desfecho. Esse modelo de avaliação foi a proposta mais bem-sucedida em aferir critérios clínicos que identifiquem a dor e o desconforto animal. O sistema MISS, que é o padrão ouro a ser seguido, inclui parâmetros de observação que devem ser checados regularmente, se possível mais de uma vez ao dia, dependendo do protocolo de irradiação. Esses parâmetros incluem: curvatura, características dos pelos, perda de peso, diarreia, aparência do animal

(pele, olhos, mucosa), características relacionadas à respiração, comportamento em geral e provocado (mobilidade, ataxia) (KOCH *et al.*, 2016).

Dentre todos os critérios avaliados na tabela MISS, vale destacar o monitoramento do peso. No trabalho de Koch e colaboradores (2016), foi observado que o monitoramento do peso de forma sistemática, todos os dias, é um bom critério a ser utilizado, pois ajuda a prever de forma mais precisa o desfecho do animal, bem como intervenções precoces que venham garantir o seu bem-estar. Em contrapartida, Nunamaker e colaboradores (2013) mensuravam o peso uma vez por semana, e, apesar de ter sido observado um valor preditivo positivo de morte relacionada à variável perda de peso quando esta oscilava de 15-20%, o grande intervalo de monitoramento não contribuiu para a redução no número de animais que vieram a óbito. Desta forma, o monitoramento diário dos animais irradiados permite um refinamento dos dados, com intervenções precoces, que garantam a sobrevida dos animais, bem como o estabelecimento de um novo critério de corte para perda de peso.

Os animais irradiados conseguem sobreviver mesmo com perda de peso de cerca de 20%, visto que a desidratação pós-irradiação já contribui com cerca de 10% da perda de peso. Animais com perda de peso acima de 20% podem recuperar o peso inicial entre 10 a 14 dias após o TMO (DURAN-STRUUCK; DYSKO, 2009). Além do monitoramento diário da perda de peso corporal, a temperatura corporal pode ser um fator preditivo de morte animal com sua diminuição de 35 ± 3°C para 29 ± 6°C (observada dentro de 1-2 dias antes do óbito ou eutanásia) (KOCH *et al.*, 2016).

Além do sistema MISS, há um outro sistema que combina os sinais clínicos com parâmetros laboratoriais, tais como contagem total de células do sangue periférico e o perfil de linhagens hematopoiéticas, além do perfil de expressão de proteínas responsivas à radiação (ligante de Flt-3, interleucina-6, fator estimulador de colônias de granulócitos G-CSF, trombopoietina, eritropoietina e amiloide A sérica) (OSSETROVA *et al.*, 2014; 2016).

Critérios histopatológicos também podem ser importantes instrumentos de análise, entretanto esse parâmetro não permite o acompanhamento do animal ao longo do experimento, pois necessita do estudo do órgão através de técnicas histológicas, o que requer a finalização do experimento e eutanásia do animal. Desta forma, outros sistemas de monitoramento que permitam o acompanhamento *in vivo* estão sendo cada vez mais utilizados. Em geral, esses sistemas utilizam marcadores fluorescentes como forma de acompanhamento, como, por exemplo, o monitoramento das células injetadas através de proteínas fluorescentes (REDDY *et al.*, 2008).

Na busca em aperfeiçoar o Sistema de Pontuação MISS 3 para o estudo de TMO, foram elencados outros critérios que compreendemos ser importantes para uma melhor acurácia e previsibilidade de morte iminente, disponibilizados na tabela 2 (Sistema de pontuação nas pesquisas com Irradiação e Transplante de Medula Óssea do Centro de Experimentação Animal do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz).

Dias de sobrevivência após a irradiação diária (100r/Dia)			
	Fêmea	Macho	
Linhagem	**Tempo médio**	**Tempo médio**	**Fonte**
129/J	33,03 (±8,58)	34,79 (±8,28)	Roderick, 1963
MA/J	31,50 (±4,93)	30,50 (±9,12)	Roderick, 1963
SJL/J	29,68 (±1,25)	30,45 (±1,97)	Roderick, 1963
SJL/J	28,05 (±0,50)		Yuhas; Storer, 1969
ST/J	29,83 (±4,82)	29,62 (±6,01)	Roderick, 1963
P/J	29,73 (±7,55)	26,23 (±9,18)	Roderick, 1963
C58/J	26,44 (±3,50)	29,52 (±6,68)	Roderick, 1963
MA/MyJ	28,76 (±6,82)	26,53 (±9,61)	Roderick, 1963
BDP/J	22,78 (±5,84)	30,86 (±5,23)	Roderick, 1963
C57L/J	22,84 (±1,77)	30,06 (±4,75)	Roderick, 1963
SWR/J	23,19 (±3,68)	26,38 (±6,17)	Roderick, 1963
SWR/J	25,23 (±0,64)		Yuhas; Storer, 1969
LP/J	23,17 (±5,96)	25,40 (±6,83)	Roderick, 1963
C57BR/cdJ	21,48 (±3,65)	26,65 (±6,61)	Roderick, 1963
C57BR/cdJ	22,40 (±0,70)		Yuhas; Storer, 1969
RF/J	22,88 (±4,79)	24,71 (±5,50)	Roderick, 1963
RF/J	23,15 (±0,80)		Yuhas; Storer, 1969
C57BL/6J	23,03 (±2,34)	24,58 (±5,76)	Roderick, 1963
C57BL/6J	23,90 (±0,50)		Yuhas; Storer, 1969
C57BL/10J	22,65 (±1,58)	24,27 (±4,43)	Roderick, 1963
C57BL/6JRk-c	21,31 (±3,37)	24,08 (±6,56)	Roderick, 1963
SM/J	21,57 (±2,59)	20,47 (±2,76)	Roderick, 1963
DBA/2J	19,41 (±4,69)	21,65 (±7,11)	Roderick, 1963
AKR/J	19,53 (±2,34)	20,59 (±4,37)	Roderick, 1963
A/J	18,84 (±2,85)	21,06 (±4,67)	Roderick, 1963
A/J	18,00 (±0,55)		Yuhas; Storer, 1969
DBA/1J	19,00 (±3,68)	20,64 (±6,03)	Roderick, 1963
A/HeJ	17,23 (±2,37)	19,93 (±2,91)	Roderick, 1963
C3HeB/FeJ	17,41 (±2,51)	18,52 (±3,12)	Roderick, 1963
C3HeB/FeJ	17,30 (±0,45)		Yuhas; Storer, 1969
RIII/AnJ	17,88 (±1,41)	18,00 (±1,91)	Roderick, 1963
C3H/HeJ	17,11 (±3,11)	17,96 (±2,87)	Roderick, 1963
BALB/cJ	16,76 (±2,56)	17,00 (±2,12)	Roderick, 1963
BALB/cJ	17,87 (±0,44)		Yuhas; Storer, 1969
CBA/J	16,55 (±2,60)	16,44 (±2,68)	Roderick, 1963
CBA/J	17,87 (±0,40)		Yuhas; Storer, 1969

Tabela 1: Tempo de resistência à radiação em diferentes linhagens murinas frente à irradiação diária (1Gy) de raios X. Dose: Yukas; Storer – 0,65 Gy/min; Roderick – 0,7 Gy/min.

Sistema de Pontuação de Intervenção Murina Adaptado		
Perda de peso	10-15%	0
	15-20%	3
	20-25%	6
	≥25%*	12
Temperatura	Normal	0
	Hipertermia	6
	Hipotermia*	12
Frequência respiratória	Respiração normal	0
	Respiração aumentada	6
	Respiração abdominal*	12
Postura	Normal	0
	Curvatura leve	3
	Curvatura moderada	6
	Curvatura grave*	12
Abertura dos olhos	Olhos abertos > 75%	0
	Olhos com abertura entre 50-75%	3
	Olhos com abertura entre 25-49%	6
	Olhos com abertura < 25%*	12
Características dos Pelos	Normal – liso e brilhante	0
	Opaco e áspero	3
	Ausência de limpeza e piloereção*	12
Comportamento geral	Mobilidade normal - ativo	0
	Mobilidade reduzida	3
	Ataxia, marcha vacilante	6
	Relutante em se movimentar	9
	Incapaz de se movimentar*	12
Aparência geral	Descarga ocular	3
	Palidez em pele e/ou mucosas	6
	Cianose em pele e/ou mucosas*	12
Pontuação total		
Pontuação		
< 12	Normal	
13–27	Monitorar pelo menos 2 vezes ao dia	
≥ 28	Eutanásia imediatamente - ou qualquer critério único 12*	

Tabela 2: Sistema de pontuação para a finalização humanitária nas pesquisas com Irradiação e Transplante de Medula Óssea do Centro de Experimentação Animal do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz. Tabela adaptada do Sistema de Pontuação de Intervenção Murina (MISS 3) de Koch et al. (2016) e Nunamaker (2013).

REFERÊNCIAS

BUCHALI, A.; FEYER, P., GROLL, J.; MASSENKEIL, G.; ARNOLD, R.; BUDACH, V. Immediate toxicity during fractionated total body irradiation as conditioning for bone marrow transplantation. **Radiother Oncol.** v.54, p. 157–162, 2000.

BURNET, F. M. The concept of immunological surveillance. **Prog Exp Tumor Res** 13, 1–27, 1970.

COOKE, K.; KOBZIK, L.; MARTIN, T. R.; BREWER, J.; DELMONTE, J.; CRAWFORD, J. M.; FERRARA, J. L. M. An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. **Blood** 88, 3230–3239, 1996.

COPELAN, E. A. Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. **New England Journal of Medicine** 354, 1813–1826, 2006.

CUI, Y-Z; HISHA, H.; YANG, G-X.; FAN, T-X.; LI, Q.; LIAN, Z.; IKEHARA, S. Optimal protocol for total body irradiation for allogeneic bone marrow transplantation in mice. **Bone Marrow Transplantation** 30, 843–849, 2002.

DICARLO, A. L.; MAHER, C.; HICK, J. L.; HANFLING, D.; DAINIAK, N.; CHAO, N.; BADER, J. L.; COLEMAN, C. N.; WEINSTOCK, D. M. Radiation injury after a nuclear detonation: medical consequences and the need for scarce resources allocation. **Disaster Med Public Health** Prep 5 Suppl 1:S32–S44, 2011.

DURAN-STRUUCK, R. & DYSKO, R. C. Principles of Bone Marrow Transplantation (BMT): Providing Optimal Veterinary and Husbandry Care to Irradiated Mice in BMT Studies. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science** 48, 12, 2009.

GOURDON, J.; JIMENEZ, A. **Post-Irradiation Care**. Comparative Medicine & Animal Resources Centre. SOP 615.03- UACC approved and effective date 09-12/2014. https://www.mcgill.ca/research/files/research/615_-_post-irradiation_care_-_sept2015.pdf

HILL, G. R. & FERRARA, J. L. M. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. **Blood** 95, 2754–2759, 2000.

KOCH, A.; GULANI, J.; KING, G.; HIEBER, K.; CHAPPELL, M.; OSSETROVA, N. Establishment of Early Endpoints in Mouse Total-Body Irradiation Model. **PLoS One**. Aug 31;11(8):e0161079, 2016.

KUSHIDA, T.; INABA, M.; HISHA, H.; ICHIOKA, N.; ESUMI, T.; OGAWA, R.; IIDA, H.; IKEHARA, S. Intra-bone marrow injection of allogeneic bone marrow cells: a powerful new strategy for treatment of intractable autoimmune diseases in MRL/lpr mice. **Blood** 97, 3292–3299, 2001.

LORENZ, E.; UPHOFF, D.; REID, T. R. & SHELTON, E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. **J Natl Cancer Inst** 12, 197–201, 1951.

MORGAN, T. L.; FALK, P. M.; KOGUT, N.; SHAH, K. H.; TOME, M.; KAGAN, A. R. A comparison of single-dose and fractionated total-body irradiation on the development of pneumonitis following bone marrow transplantation. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**. 36, 61–66, 1996.

NASERIAN, S.; LECLERC, M.; THIOLAT, A.; PILON, C.; LE BRET, C.; BELKACEMI, Y.; MAURY, S.; CHARLOTTE, F.; COHEN, J. L. Simple, Reproducible, and Efficient Clinical Grading System for Murine Models of Acute Graft-versus-Host Disease. Frontiers in Immunology 9, 2018.

NUNAMAKER, E. A.; ARTWOHL, J. E.; ANDERSON, R. J. & FORTMAN, J. D. Endpoint Refinement for Total Body Irradiation of C57BL/6 Mice. **Comparative Medicine** 63, 7, 2013.

OSSETROVA, N. I.; NEY, P. H.; CONDLIFFE, D. P.; KRASNOPOLSKY, K. & HIEBER, K. P. Acute Radiation Syndrome Severity Score System in Mouse Total-Body Irradiation Model. **Health Physics** 111, 134–144, 2016.

OSSETROVA, N. I.; SANDGREN, D. J. & BLAKELY, W. F. Protein biomarkers for enhancement of radiation dose and injury assessment in nonhuman primate total-body irradiation model. **Radiation Protection Dosimetry** 159, 61–76, 2014.

PIERCE, G. E.; WATTS, L. M. & CLANCY, J. Sublethal fractionated total-body irradiation and donor bone marrow infusion for induction of allograft tolerance. **Transplantation** 39, 236–241, 1985.

REDDY, P.; NEGRIN, R. & HILL, G. R. Mouse models of bone marrow transplantation. **Biology of Blood and Marrow Transplantation** 14, 129–135, 2008.

REKERS, P. E. Transplantation of Bone Marrow into Dogs That Have Received Total Body Single Dose Radiation. **University of Rochester Atomic Energy Project**, U. R. 11, 1948.

REKERS, P. E. Effect of transplantation of bone marrow into irradiated animals. **Arch Surg** 60, 635, 1950.

RODERICK, T. H. The response of twenty-seven inbred strains of mice to daily doses of whole-body x-irradiation. **Radiat res** 20, 631–639, 1963.

WASELENKO, J. K.; MACVITTIE, T. J.; BLAKELY, W. F.; PESIK, N.; WILEY, A. L.; DICKERSON, W. E.; TSU, H.; CONFER, D. L.; COLEMAN, C. N.; SEED, T.; LOWRY, P.; ARMITAGE, J. O.; DAINIAK, N. Strategic National Stockpile Radiation Working Group. Medical management of the acute radiation syndrome: recommendations of the Strategic National Stockpile Radiation Working Group. **Annals of Internal Medicine** 140, 1037–1051, 2004.

YUHAS, J. M. & STORER, J. B. On mouse strain differences in radiation resistance: hematopoietic death and the endogenous colony-forming unit. **Radiat Res** 39, 608–622, 1969.

CONTROLE DE QUALIDADE E SEGURANÇA

Data de aceite: 03/07/2023

Murilo Vieira da Silva
Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG
ORCID 0000-0002-3397-0113

Rodrigo Müller
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos -Bio-Manguinhos – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro – RJ
ORCID 0000-0002-5828-6254

O uso de animais para fins científicos é uma prática de longa data na investigação biológica e medicina. As notáveis semelhanças anatômicas e fisiológicas, além do compartilhamento de genes entre humanos e animais, particularmente mamíferos, levaram os pesquisadores a investigarem uma grande variedade de mecanismos e avaliar novas terapias em modelos animais experimentais antes de aplicar suas descobertas aos humanos e outros animais, garantindo, assim, além da eficácia, a segurança desses produtos (BARRÉ-SINOUSSI; MONTAGUTELLI, 2015). Os testes de pirogênio e neurovirulência, bem como os de toxicidade aguda, crônica e inespecífica, são de fundamental importância para a garantia dessa qualidade e segurança, e, portanto, alvos de nossa discussão neste capítulo. A regulamentação para utilização de animais em testes no Brasil cabe ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA); sobre a biossegurança laboratorial, à Comissão Nacional Técnica de Biossegurança (CTNBIO), e as normas devem ser constantemente observadas e cumpridas, assim como toda a regulamentação que garanta a qualidade, segurança e aceitabilidade do teste a ser realizado, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Farmacopeia.

A construção do conhecimento científico e desenvolvimento tecnológico é um processo de consolidação pautado na evolução, revisão e aprimoramento de métodos e produtos. Desse modo, o uso de animais como métodos também é alvo para o desenvolvimento de conhecimento pautado na legislação e ética. Nesse

sentido, cabe ressaltar que existe atualmente uma busca incessante pelo refinamento, pela redução e substituição (*The Principles of Humane Experimental Technique* - Princípio dos 3Rs) dos modelos animais (RUSSELL; BURCH, 1959), até então imprescindíveis para o desenvolvimento científico. Dentre esses modelos, diretamente ligados aos testes discutidos neste capítulo, podemos exemplificar: Lisado de Amebócitos do *Limulus* (LAL) e Teste de Ativação de Monócitos (MAT) para pirógenos e os testes de Toxicidade Aguda Oral - Procedimento de Doses Fixas (OECD TG 420), Toxicidade Aguda Oral - Classe Tóxica Aguda (OECD TG 423), Toxicidade Aguda Oral - procedimento "*Up and Down*" (OECD TG 425) e estimativa da dose inicial para teste de toxicidade aguda oral sistêmica (OECD TG 129) para toxicidade aguda (BRASIL, 2015; 2019).

Contudo, enquanto a substituição completa de animais não é uma realidade, é importante que todos os testes sejam realizados dentro dos princípios éticos e legais da experimentação animal, indo ao encontro do refinamento constante de técnicas e consequente redução do número de animais utilizados. Para isso, é premissa a presença de uma equipe técnica qualificada, de preferência multidisciplinar, que conheça a fundo os modelos animais a serem utilizados nos testes e que possa dar todo suporte para o pesquisador, seja por meio de treinamento ou acompanhamento em tempo integral. Ainda, o conhecimento, por todos envolvidos, da etologia do modelo animal utilizado, e a supervisão de médico veterinário com conhecimento específico e disponibilidade para acompanhar os procedimentos/testes, bem como treinar os demais membros da equipe para o acompanhamento clínico dos animais, e quando necessária a adoção de pontos finais humanitários (*endpoints*), dentre eles a eutanásia, também é indispensável.

É importante ressaltar que nem sempre o *endpoint* dos animais requer eutanásia e, portanto, Comissões de Ética animal no Uso de Animais (CEUAs) possuem papel fundamental na aprovação dos protocolos, bem como seu acompanhamento. Devem sempre solicitar à equipe a apresentação dos possíveis danos aos animais, e quais pontos finais humanitários serão adotados. São exemplos de *endpoints*: protocolos de analgesia e analgesia mais eficientes e planejados para o ensaio específico, levando em consideração particularidades de espécie e linhagens/colônias, reaproveitamento do animal, removê-lo do estudo, implementação de períodos de descanso entre os estudos, aposentadoria do animal de pesquisa ou mesmo adoção (NUNAMAKER *et al*., 2021). Para determinação do *endpoint*, o pesquisador principal, que tem conhecimento preciso tanto dos objetivos do estudo quanto do modelo proposto, deve identificar, explicar e incluir no protocolo de uso de animais um desfecho do estudo que seja humano e cientificamente válido (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2011).

Entretanto, para adoção de qualquer *endpoint* é necessário o acompanhamento clínico dos animais durante todo o protocolo. Este então, é o principal fator balizador de todas as decisões a serem tomadas. Portanto, a experiência no diagnóstico do distresse, da ausência de saúde, da dor e desconforto é indeclinável. Uma vez que os roedores

são seres não-verbais, presas por natureza e, portanto, podem manifestar sinais sutis de dor, a identificação desse desconforto, associado a sinais de bem-estar, são desafiadores e fundamentais para garantir a aceitabilidade ética de trabalhar com esses animais em pesquisas (TURNER; PANG; LOFGREN, 2019). Dentre as diferentes vias para detecção, algumas das mais recentes são: aplicação de etogramas, escalas de alteração facial e construção de ninhos. Elas avaliam alteração de comportamento instantâneo, sendo necessário o acompanhamento regular antes e após uso do animal nos testes, bem como a associação de duas ou mais metodologias de diagnóstico. Assim, consegue-se aprimorar o tratamento e cuidado com consequente melhoria no bem-estar geral dos animais.

Para uma avaliação confiável de bem-estar animal em roedores, é importante considerar que a presença do próprio observador pode ser um fator de confusão, pois já foi demonstrado que espécies presas têm um impulso natural para suprimir comportamentos de dor na presença de outro animal, especialmente se perceberem que esse outro pode representar uma ameaça. Como exemplo, os camundongos que demonstram a capacidade de suprimir caretas, dificultando o uso da Escala de Grimace (MILLER; LEACH, 2015; OLIVER *et al.*, 2017). Portanto, os métodos que podem ser conduzidos indiretamente, sem a presença de um humano, como por meio de vídeo remoto, podem ser particularmente úteis para avaliações de dor nessa espécie.

Uma avaliação geral da saúde e do bem-estar do modelo experimental inclui uma avaliação do animal em sua gaiola e um exame clínico prático. Ao observar cuidadosamente os animais na gaiola com foco no grau de atividade, construção do ninho, interação com outros animais e aparência geral, tem-se indicadores valiosos. De forma complementar, o exame físico pode fornecer informações sobre a hidratação do animal, condição corporal e anormalidades (BURKHOLDER, 2012). Para tal, adotando como modelo experimental os camundongos, apresentamos abaixo um quadro com intuito de direcionar a avaliação (Quadro 1).

O acompanhamento clínico e comportamental por profissionais treinados é fundamental para o estabelecimento dos limites para *endpoints.* Esse monitoramento deve ser feito com frequência capaz de detectar as possíveis alterações clínicas a serem apresentadas pelos animais, inclusive em finais de semana e feriados. A determinação desses pontos finais humanitários é um grande desafio em todos os protocolos experimentais, pois o ideal é que os objetivos científicos possam ser alcançados sem efeitos adversos, dor ou angústia para os animais. No entanto, nem sempre isso é possível, sobretudo nos testes de qualidade e segurança, em que fatores como apresentação de quadro clínico febril (ex: testes de pirógenos), alterações neurológicas (ex: testes de neurovirulência), morbidade e mortalidade (ex: CL50 e DL50) são indicadores de que o produto possa ser ou não utilizado. Neste sentido, é fundamental uma ação conjunta entre CEUA da instituição e pesquisadores envolvidos, para que se consiga o estabelecimento dos limites para *endpoints*, garantindo a reprodutibilidade e confiabilidade dos dados, principalmente que

os ensaios sejam realizados de acordo com a regulamentação pertinente.

Nesse contexto, a aplicação do refinamento de técnicas é premissa para condução dos testes. Esse refinamento pode ser observado em várias ações que não comprometam a qualidade dos resultados preconizada por órgãos regulamentadores. Desse modo, destaca-se o treinamento adequado e desenvolvimento de habilidades do operador em ensaios de neurovirulência, por exemplo, em que a acurácia do operador na administração intracerebral é extremamente importante para a sobrevivência do animal, pois quando a aplicação é realizada de forma inadequada, pode culminar em óbito do animal por trauma.

A seleção de uma via de administração específica deve equilibrar uma série de fatores - por exemplo, o volume e as propriedades físico-químicas da substância, a velocidade necessária e outros pontos, como o grau de irritação que se pode ocasionar no tecido. Por isso, em testes de toxicidade esses fatores devem ser avaliados com cautela.

É essencial que haja uma estrutura geral e de liderança para prover uma cultura de cuidado, que seja amplamente disseminada quanto aos efeitos de quaisquer substâncias administradas nos animais, como e por quem essas substâncias são administradas e as técnicas empregadas na administração.

Alguns exemplos demonstrados pelo *National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research* (NC3Rs) (NC3Rs, 2021) são importantes para demonstrar que práticas desarmoniosas com o bem-estar animal são muito comuns, tais como: Você injetaria em alguém uma agulha hipodérmica usada? Injetar em um cachorro? Se não, por que não? Então, por que você usaria a mesma agulha hipodérmica descartável para injetar em mais de um animal de laboratório? Essas agulhas são vendidas e claramente etiquetadas para “uso único”. Há evidências claras de que, depois que a agulha penetra na pele, a ponta fica deformada e os produtos de tecido aderem ao metal danificado. A força mecânica necessária para a inserção da agulha e a dor resultante estão diretamente relacionadas à nitidez da agulha; as agulhas rombas e usadas causarão ao animal dor desnecessária e danos aos tecidos. Além disso, a reutilização de agulhas aumenta as chances de propagação da infecção entre os animais. Ambos os aspectos do aumento da dor e do potencial de transmissão de infecções são variáveis confusas e completamente desnecessárias para a ciência (NC3Rs). Importante ressaltar que a reutilização de agulhas hipodérmicas descartáveis é inaceitável.

Se não podemos reservar um tempo para fazer um estudo corretamente, com práticas de trabalho adequadas, então não devemos realizá-lo. Essas práticas do dia a dia, como injetar uma agulha usada em um animal, demonstram se a nossa cultura de cuidados realmente está funcionando como deveria.

É muito importante que práticas como essa não sejam realizadas em uma instalação animal. Elas demonstram se estamos trabalhando em um alto padrão de cuidados.

A institucionalização de Procedimentos Operacionais Padronizados (POPs) deve ser realizada e multiplicada a todos os colaboradores envolvidos na experimentação

animal, e o treinamento desses POPs deve ser ministrado por profissionais competentes e experientes nas técnicas experimentais a serem realizadas. Deve haver uma avaliação de competência pelo instrutor e o monitoramento se a técnica está ou não sendo realizada de forma eficiente (MULLER *et al*., 2020).

A expertise nas técnicas experimentais é um ponto muito importante a ser monitorado, todavia o acompanhamento dos animais em experimentação deve ser realizado de forma unívoca, de modo que todos os envolvidos nesse processo consigam ter a mesma percepção e sensibilidade do estado do animal em todo o processo, desde o alojamento e manejo inicial com o animal até a finalização do protocolo. Essa fase final deve realizada da forma mais humanitária possível, segundo regulamentação do CONCEA como a diretriz referente aos procedimentos de eutanásia realizados em animais incluídos em atividades de ensino ou de pesquisa científica.

De forma geral, ressalta-se que a qualificação profissional, o conhecimento das normas que regulamentam os testes de pirogênio, neurovirulência e toxicidade, bem como das relativas ao uso de animais e de biossegurança, devem ser sempre cumpridas. Ainda, é necessário o estabelecimento da cultura do cuidado, atenção constante aos princípios éticos da experimentação animal, para que produtos possam ser desenvolvidos com segurança e qualidade.

Os animais de laboratório são considerados elementos fundamentais da experimentação, portanto, é indispensável a sua padronização para uso em pesquisas, pois diminui o número de animais necessários para atingir a exatidão do experimento (MEZADRI; TOMÁZ; AMARAL, 2004). A padronização desses animais, atrelada à experiência da equipe, corroboram uma maior acurácia. Animais que possuam certificação sanitária e genética são essenciais para minimizar as possíveis interferências relacionadas a esses quesitos, contribuindo fundamentalmente para uma pesquisa científica de alta qualidade e reprodutível. A qualidade dos animais depende diretamente da infraestrutura das instalações, que devem garantir o controle sanitário e o bem-estar animal, seguindo os princípios éticos. Dessa forma, a melhoria da infraestrutura dos biotérios é indispensável à pesquisa de fármacos e medicamentos e constitui-se em um dos gargalos que as políticas atuais de incentivo tentam eliminar (LAINETTI, 2009).

No contexto de um Sistema da Garantia da Qualidade (SGQ) em um Biotério, constituem-se parte dos requisitos essenciais a infraestrutura e equipamentos adequados, pessoal técnico capacitado e qualidade sanitária dos animais. Essas são ações fundamentais para a maior reprodutibilidade de resultados experimentais e bem-estar animal, as quais são premissas indispensáveis.

A qualidade dos estudos *in vivo*, a ética e a reprodutibilidade científica são imprescindíveis para a pesquisa científica mundial, respeitando as legislações vigentes e promovendo a busca contínua das melhores práticas de experimentação animal para o desenvolvimento e avanço da biotecnologia.

As instituições que utilizam animais com finalidade de ensino e pesquisa necessitam

de estrutura adequada, aprimoramento na gestão e execução da experimentação animal, bem como da implementação de um sistema de qualidade, controle e treinamento. A implantação de um sistema de gestão da qualidade integrado às Boas Práticas, essas aliadas à capacitação técnica, promove maior sucesso e confiança nos resultados dos testes realizados. Consequentemente, contribui diretamente para o princípio dos 3Rs e culmina na credibilidade e reprodutibilidade da pesquisa.

<table>
<tr><th colspan="3">Monitoramento Clínico Geral
Pesquisadores e Médicos Veterinários</th></tr>
<tr><td rowspan="5">Avaliação pela caixa</td><td>Observação</td><td>Recomendação</td></tr>
<tr><td>Move-se ao redor da gaiola, limpa-se (grooming), come, bebe e interage com outros? *</td><td>Permanece no grupo experimental</td></tr>
<tr><td>Produziu novo ninho após 24 horas da troca da gaiola? **</td><td>Permanece no grupo experimental</td></tr>
<tr><td>Existem fezes na gaiola após 24 horas da troca? ***</td><td>Permanece no grupo experimental</td></tr>
<tr><td>Ao avaliar as expressões faciais, você detectou que o (s) animal(ais) apresenta(m) um ou mais sinais de dor/distresse?

Sinais: olhos semicerrados; pele contraída ao redor do nariz; orelhas puxadas para trás.</td><td>Avaliação imediata por Médico Veterinário
Adoção de endpoint</td></tr>
<tr><td rowspan="4">Avaliação em mãos</td><td>Apresenta sinais de desidratação como: paralisia de membros posteriores e dificuldade de agarrar e segurar tampa aramada da caixa (fraqueza), afundamento dos olhos e/ou demora para retorno ao estado normal da pele, quando esta é beliscada na região das escápulas?</td><td>Avaliação imediata por Médico Veterinário
Adoção de endpoint</td></tr>
<tr><td>Ao palpar os ossos sacroilíacos, é possível senti-los, mas sem a sensação de ossos proeminentes? ****</td><td>Permanece no grupo experimental</td></tr>
<tr><td>Os dentes incisivos apresentam oclusão e desgaste normais?</td><td>Permanece no grupo experimental</td></tr>
<tr><td>As membranas mucosas (boca, olho e genitais) apresentam coloração rosa?</td><td>Permanece no grupo experimental</td></tr>
</table>

*Os camundongos são curiosos e ativos, esses comportamentos são observados especialmente depois de serem estimulados por terem algum manejo em sua gaiola.

**É importante que na nova gaiola haja material apropriado para confecção do ninho.

***Ausência de fezes pode ser um indicativo de que o(s) animal (ais) não está (ão) se alimentando.

****Avaliação da condição corporal em camundongos, passando um dedo sobre os ossos sacroilíacos (a coluna e os ossos do quadril) e atribuição de uma pontuação de 1 a 5 é uma medida sensível de bem-estar, mais do que avaliar o peso corporal. A pontuação de 1 indica emagrecimento e uma pontuação de 5, obesidade. Em um camundongo perfeitamente condicionado, pontuado como 3, os ossos são palpáveis, mas não proeminentes (FOLTZ & ULLMAN-CULLERE, 1999; ULLMAN-CULLERE & FOLTZ, 1999).

Quadro 1. MODELO DE QUADRO PARA MONITORAMENTO CLÍNICO GERAL DE ANIMAIS SUBMETIDOS A TESTES DE CONTROLE DE QUALIDADE E SEGURANÇA

Fonte: Hess *et al*., 2008; Langford *et al*., 2010

REFERÊNCIAS

BARRÉ-SINOUSSI, F.; MONTAGUTELLI, X. Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. **Future Sci OA,** 1(4): FSO63, 2015.

BRASIL. **Resolução Normativa nº 18, de 24 de Setembro de 2014**. Conselho Nacional de Controle de Experimentação. Disponível em: <https://antigo.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-18-de-24.09.2014-D.O.U.-de-25.09.2014-Secao-I-Pag.-9.pdf>). Acesso em: 01 nov. 2021.

BRASIL. Resolução Normativa nº 45, de 22 de outubro de 2019. Conselho Nacional de Controle de Experimentação. Disponível em: <https://antigo.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-n-45.pdf> Acesso em: 02 nov. 2021.

BURKHOLDER, T.; FOLTZ, C.; KARLSSON, E.; LINTON, C. G & SMITH, J. M. Health Evaluation of Experimental Laboratory Mice. **Current Protocols in Mouse Biology** 2: 145-165, 2012.

HESS, S. E., ROHR, S.; DUFOUR, B. D.; GASKILL, B. N.; PAJOR, E. A. & GARNER, J. P. Home improvement: C57BL/6J mice given more naturalistic nesting materials build better nests. J. **Am. Assoc. Lab. Anim**. Sci. 47:25-31, 2008.

LAINETTI, E. B. **Análise Crítica para adequação física e implantação de novos procedimentos na Divisão de Animais de Laboratório do IPEN** - Dissertação (mestrado). São Paulo: Instituto de pesquisas energéticas e nucleares, 2009.

LANGFORD, D. J.; BAILEY, A. L.; CHANDA, M. L.; CLARKE, S. E.; DRUMMOND, T. E.; ECHOLS, S.; GLICK, S.; INGRAO, J.; KLASSEN-ROSS, T.; LACROIX-FRALISH, M. L.; MATSUMIYA, L.; SORGE, R. E.; SOTOCINAL, S. G.; TABAKA, J. M.; WONG, D.; VAN DEN MAAGDENBERT, A. M.; FERRARI, M. D.; CRAIG, K. D. & MOGIL, J. S. Coding of facial expressions of pain the laboratory mouse. **Nat. Methods** 7:447-450, 2010.

MEZADRI, T.; TOMÁZ, V.; AMARAL, V. L. **Animais de laboratório**: cuidados na iniciação experimental. Universidade Federal de Santa Catarina, v. Cap. 1, p. 32–37, 2004.

MILLER, A. L.; LEACH, M. C. The Mouse Grimace Scale: a clinically useful tool? **PLoS One** 10:1–10. 10.1371/journal.pone.0136000, 2015.

MÜLLER, R.; SILVA, B. J. D.; ALMEIDA, Alex Costa de; VILELA, L. T.; NETO, Plinio de Araujo Oliveira; FREITAS, T. S.; LOPES, I. G. Importância da capacitação da equipe bioterista em um novo modelo operacional na experimentação animal e na reprodutibilidade dos resultados. **International Journal of Development Research**, p. 39638-39641, 2020.

NATIONAL CENTRE FOR THE REPLACEMENT, REFINEMENT AND REDUCTION OF ANIMALS IN RESEARCH Disponível em: https://nc3rs.org.uk/news/reuse-needles-indicator-culture-care. Acesso em: 24 out. 2021.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**, 8th ed. National Academies Press, Washington, D.C. 2011. Disponível em: http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-Care-and-Use-ofLaboratory-Animals.pdf).

NUNAMAKER, E. A.; DAVIS, S.; O'MALLEY, C. I.; TURNER, P. V. Developing Recommendations for Cumulative Endpoints and Lifetime Use for Research Animals. **Animals**, 11(7): 2031, 2021.

OLIVER, V. L.; ATHAVALE, S.; SIMON, K. E.; KENDALL, L. V.; NEMZEK, J. A.; LOFGREN, J. L. Evaluation of pain assessment techniques and analgesia efficacy in a female guinea pig (*Cavia porcellus*) model of surgical pain. **J Am Assoc Lab Anim Sci** 56:425–435, 2017.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The Principles of Humane Experimental Technique**. Methuen: London, UK; UFAW: Potters Bar, UK; Herts, UK, 1959; p. 239.

TURNER, P. V.; PANG, D. S.; LOFGREN, J. L. A Review of Pain Assessment Methods in Laboratory Rodents. **Comp Med.** 2019;69(6):451-467. doi:10.30802/AALAS-CM-19-000042.

CAPÍTULO 14

EUTANÁSIA PARA ROEDORES E LAGOMORFOS

Data de aceite: 03/07/2023

Monica Souza Ferreira Pinto
Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) / Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)
ORCID 0000-0003-0829-9994

1 | INTRODUÇÃO

A humanidade vem buscando para si, através dos séculos, uma morte na qual não haja distresse nem dor. No Egito de Cleópatra VII, foi criada uma academia para que se estudassem formas de se obter uma morte menos dolorosa. Vemos na citação do Imperador Romano Otavio César Augusto "A morte que o destino lhe concedeu foi suave, tal qual sempre desejara: pois, todas as vezes que ouvia dizer que alguém morrera logo e sem padecimentos, almejava para si e para os seus, igual 'eutanásia' (conforme a palavra que costumava empregar)" seu desejo por uma morte rápida e sem padecimentos (PINTO, CORRÊA, & SILVA, 2020). Portanto, se os humanos buscam uma morte sem dor, sem distresses, por que não aplicarmos o mesmo desejo para a morte animal?

A definição mais conhecida de eutanásia é do grego: *"Eu"* – BOM e *"Thanatos"* – MORTE , também conhecida como *"Boa Morte"* (BRASIL, Resolução Normativa Nº37, 2018).

A eutanásia, na visão do CONCEA, constitui-se como o "modo humanitário de matar o animal, sem dor e com mínimo estresse. É a prática de causar a morte de um animal de maneira controlada e assistida". Justifica-se para o bem do próprio indivíduo, em casos de dor ou distresse, que não podem ser mitigados de imediato com analgésicos, sedativos ou outros métodos, quando o estado de saúde ou bem-estar do animal impossibilite o tratamento ou socorro (de acordo com o parágrafo 1º do artigo 14 da Lei nº 11.794, de 2008) ou para fins didáticos ou científicos. Para todas essas situações, o termo "eutanásia" será usado em todos os casos acima descritos, uma vez que as técnicas são similares (BRASIL, Lei Nº11.794, de 08 de outubro de 2008, 2008).

A figura obrigatória do Responsável Técnico (RT) da instalação animal deve ter o título de Médico Veterinário com registro ativo no Conselho de Medicina Veterinária e Zootecnia (CRMV) da Unidade Federativa em que o estabelecimento está localizado. Este tem por compromisso ético supervisionar, mesmo que de forma não presencial, a eutanásia (BRASIL, Lei Nº11.794, de 08 de outubro de 2008, 2008). Também deve ser o responsável pelo treinamento da equipe que ficará responsável pela eutanásia. Nesse treinamento, além das técnicas, deverão ser passados os conceitos éticos sobre a questão, assim como análise da disponibilidade em realizar a eutanásia, tendo em vista que ninguém deverá ser "obrigado" a realizá-la. Deve-se levar em consideração, além das questões técnicas, as questões psicológicas que envolvem tal prática. Esse pensamento corrobora a colocação feita pela *American Veterinarian Medical Association* (AVMA, 2020) que ressalta que "cabe ao RT a responsabilidade de garantir que, se a vida de um animal for tirada, que isso seja feito com o mais alto grau de respeito e com ênfase em tornar a morte o mais indolor e sem distresse possível". (AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals., 2020).

2 | QUESTÕES RELACIONADAS AO "SER HUMANO" QUE IRÁ PRATICAR A EUTANÁSIA

Toda a responsabilidade que vem atrelada à prática da eutanásia em animais utilizados em pesquisas ressalta a importância da chamada "fadiga por compaixão", que é uma síndrome que causa exaustão física e emocional em decorrência do custo empático de lidar com o distresse alheio.

A fadiga por compaixão tem sido considerada a principal ameaça à saúde mental dos profissionais de saúde, e aqui podemos incluir os profissionais da Ciência de Animais de Laboratório (CAL) (LAGO & CODO, 2013). Pessoas que trabalham direta ou indiretamente em pesquisa com animais podem experimentar formas de fadiga por compaixão. Expandindo a conversa, podemos incluir vários grupos, como a equipe de lavagem da gaiola, membros da Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA), apoio administrativo, funcionários e fornecedores. O estresse nesses profissionais pode ser tão aparente quanto naqueles profissionais que lidam diretamente com a morte com o ponto final dos estudos. Colocar uma solicitação de animais para serem utilizados em um projeto de pesquisa, estando totalmente ciente de que a maioria desses animais serão eutanasiados no final, pode gerar fadiga por compaixão. Por esse motivo, a conscientização e o reconhecimento do efeito emocional do trabalho na CAL é imperativo (NEWSOME, et al., 2019).

Os profissionais da Medicina Veterinária, assim como todos os outros profissionais da área da CAL, dedicam-se intensamente aos animais de que cuidam, além de ficarem diariamente expostos a diferentes tipos de fatores estressantes. Um desses fatores de extrema importância se relaciona com a eutanásia, grande causadora de conflitos éticos e morais nos profissionais, que são afetados por intenso distresse psíquico quando da

sua realização. A exaustão emocional abrange sentimentos de desesperança, solidão, depressão, raiva, impaciência, irritabilidade, tensão, diminuição de empatia, sensação de baixa energia, fraqueza, preocupação, aumento da suscetibilidade para doenças, cefaleias, náuseas, tensão muscular, dor lombar ou cervical, distúrbios do sono (ZANI, ROSA, & MACHADO, 2020). A fadiga da compaixão também resulta em empatia reduzida para com os outros (colegas de trabalho e entes queridos) e pode diminuir a qualidade dos cuidados médicos prestados aos animais (NEWSOME, et al., 2019). Os métodos físicos de eutanásia são os que geram maior fadiga de compaixão nesses profissionais (LAFOLLETTE, et al., 2020).

Além das questões éticas e relacionadas à saúde mental de cada um, temos outras situações envolvidas. O profissional deverá ter qualificação técnica específica e/ou experiência que deverá ser comprovada; terá de comprovar que sabe utilizar os métodos que serão empregados, conhecer as espécies com as quais trabalhará, dominar métodos de contenção humanitários e reconhecer os comportamentos relacionados à dor e ao desconforto que sejam relacionados aos métodos e às espécies utilizadas. Os métodos utilizados devem ser visualmente aceitáveis e com baixo risco para a equipe e animais. Deve-se ter cuidado com a utilização de medicações com potencial entorpecente para o ser humano (BRASIL, Resolução Normativa Nº37, 2018).

3 | O BEM-ESTAR DOS ANIMAIS QUE SERÃO SUBMETIDOS A EUTANÁSIA

A eutanásia se inicia junto com todo o processo de criação e experimentação.

Qual alojamento é utilizado? Qual material de cama? Qual quantitativo de animais por caixa? Há água e comida *ad libitum*? Recebem enriquecimento ambiental? São manejados com respeito e cuidado? Foram inoculados? Foram submetidos a procedimentos cirúrgicos? Enfim, são questões que irão influenciar diretamente na saúde desse animal, que, por consequência, irão influenciar o método a ser utilizado. Estes devem ser transportados, contidos (se for o caso) com o máximo cuidado e zelo por parte do profissional que irá fazer a eutanásia. O local onde serão realizados os procedimentos da eutanásia devem ser limpos e tranquilos. Os animais devem aguardar o momento da eutanásia sem que vejam ou sintam o cheiro dos animais que estão sendo eutanasiados. Os equipamentos e materiais devem ser limpos antes da próxima utilização. A idade e a espécie devem ser consideradas na escolha do método. Equipamentos que forneçam agentes inalatórios irão oferecer a vantagem da não manipulação desses animais e possibilitar a eutanásia de um quantitativo maior por vez, de forma simultânea, no caso de roedores. Obviamente, a utilização desses equipamentos deverá preservar o bem-estar dos animais, incluindo as peculiaridades das espécies e a saúde do profissional que acompanha esse momento. É muito importante nos atentarmos à expressão de dor nos animais, essa pode ser bastante sutil. O fato de os animais não aparentarem estar sentindo dor não quer dizer que esta

não esteja ocorrendo. A postura corporal, expressão facial, alterações comportamentais e fisiológicas são metodologias utilizadas para avaliação da dor nos animais. Os técnicos, pesquisadores, alunos e todos que lidem diretamente com os animais devem ter treinamento específico para esse tipo de avaliação. A comprovação do óbito é outro ponto de fundamental importância, principalmente em animais neonatos. Deve-se garantir que os animais que foram submetidos à eutanásia tenham realmente vindo à óbito antes do descarte das carcaças. Lembrando sempre que tudo deve ser feito com todo respeito e paciência, sem pressa e afobação (BRASIL, Resolução Normativa Nº37, 2018).

4 | OS MÉTODOS DE EUTANÁSIA

No Brasil, a Resolução Normativa nº 37, publicada em fevereiro de 2018, baixa a diretriz da prática de eutanásia do CONCEA e cita todas as normas que deverão ser seguidas para execução da eutanásia nos biomodelos utilizados.

O CONCEA recomenda que o método de eutanásia garanta uma inconsciência rápida, irreversível e desprovida de experiência emocional ou física desagradável. O animal não deve experenciar dor, distresse, apreensão ou ansiedade. Vejamos que o método de eutanásia mais próximo ao ideal desejado deverá atender a todos ou a maioria desses critérios. Independentemente do método utilizado, a inconsciência deve anteceder a parada cardiorrespiratória, seguida da perda da função cerebral. O método que não abarque essas "qualidades" é inaceitável e indesejável. São métodos cruentos os que utilizam uso de vácuo, uso isolado de miorrelaxantes em animais conscientes antes da parada cardiorrespiratória. A RN 37 se baseia no princípio de que a dor só é reconhecida a partir de um estímulo nociceptivo, isto é, quando o córtex cerebral e estruturas subcorticais forem funcionais; por outro lado, animais inconscientes não percebem a dor.

Os métodos são normalmente divididos em físicos ou químicos. Os agentes químicos, como anestésicos injetáveis e inalatórios, normalmente, são preferíveis aos métodos físicos, como deslocamento cervical e decapitação. Os químicos, mais frequentemente utilizados, são os agentes anestésicos injetáveis ou inalatórios. Lembrando sempre que, caso a finalidade do estudo impeça a utilização de anestésicos injetáveis ou inalatórios, estes deverão ser substancialmente justificados perante a CEUA. Nesse caso, deverão ser tomadas todas as medidas necessárias para que qualquer impacto sobre o bem-estar animal seja minimizado. Caso essa fundamentação não seja substancialmente embasada perante a CEUA, caberá a esta solicitar um estudo piloto que valide o método alternativo pleiteado (BRASIL, Resolução Normativa Nº37, 2018).

5 | MÉTODOS DE EUTANÁSIA PARA ROEDORES (ROEDORES E PEQUENOS MAMÍFEROS - CAMUNDONGOS, RATOS, HAMSTER, GERBIL, COBAIOS) PELA RN 37 DO CONCEA (BRASIL, RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº37, 2018).

5.1 Métodos Recomendáveis

- Barbitúrico intravenoso ou intraperitoneal (em casos excepcionais quando da impossibilidade da administração intravenosa).

- Anestésicos gerais intravenosos (exemplo: propofol, pela via intravenosa).

- Anestésicos inalatórios (exemplo: isoflurano).

Os agentes inalatórios precisam atingir uma concentração alveolar para serem efetivos, levando algum tempo para causar a inconsciência no animal. Quando a morte induzida pelos anestésicos inalatórios for lenta, um segundo método deve ser aplicado para garantir a morte rápida antes que este recobre a consciência. A adequação do método depende se o animal passa ou não por um período de estresse entre o tempo de início da inalação do agente e o tempo até a perda da consciência. Agentes que induzam convulsão antes da perda da consciência são inaceitáveis. O animal deverá ser observado por 10 minutos após a interrupção do fornecimento do agente inalatório, em ar ambiente, para assegurar a morte. Os anestésicos inalatórios podem ser embebidos em algodão ou disponibilizados por um aparelho de anestesia. No primeiro caso, para pequenos roedores, o algodão embebido com anestésico pode ser colocado em um recipiente fechado juntamente com o animal, com uma separação física entre o animal e o algodão, para evitar o contato direto do animal com o líquido no algodão, dada a irritação das mucosas, fazendo com que ele seja exposto apenas ao vapor. Os agentes inalatórios apresentam algumas questões ocupacionais para os seres humanos, como maior incidência de aborto espontâneo, teratogenicidade, mutagenicidade e problemas respiratórios. Para evitar esse risco, deve-se utilizar sistemas de exaustão para minimizar o contato dos operadores com os anestésicos. Essas informações estão na RN 37 do CONCEA.

Anestésicos inalatórios nas concentrações padrões de anestesia têm como propósito a reversibilidade, portanto, cabe aqui a utilização de formas de fornecimento do anestésico que possibilitem overdose. Qual o tempo ideal para uma inconsciência rápida? Quanto tempo é característico para uma morte lenta? Animais corretamente anestesiados, em plano cirúrgico, estão inconscientes e, dependendo do anestésico utilizado, apresentam algum grau de analgesia, portanto sem experenciar angústia, estresse e dor.

A sobredosagem da associação de anestésicos dissociativos (exemplo: cetamina) e agonistas de adrenorreceptores alfa 2 (exemplo: xilazina) pode ser administrada pelas vias intravenosa, intramuscular ou intraperitoneal em casos excepcionais, quando da impossibilidade de administração intravenosa.

Após a perda do reflexo corneal, os métodos acima podem ser complementados

com utilização de cloreto de potássio associado ou não a bloqueador neuromuscular, ambos por via intravenosa.

5.2 Métodos Aceitos com Restrição

- CO_2: desde que sejam seguidas as recomendações dessa diretriz referentes ao item 8.13.5.6. Em roedores, o CO2 é aceito com restrição, desde que seja utilizado em câmaras específicas em que se mensure o fluxo de CO2, por meio de fluxômetro. Para causar a morte em roedores, deve-se preencher a câmara com um fluxo de 100% de CO2 na ordem de 20% do volume da câmara por minuto e manter o fluxo por pelo menos um minuto após a morte clínica. O CO2 da câmara deverá ser removido entre dois procedimentos consecutivos de eutanásia (para maiores detalhes, vide RN 37 CONCEA). Apesar de o CO_2 ser listado como um método de eutanásia e de, em altas concentrações, apresentar efeito analgésico e anestésico geral, este não é considerado um método humanitário para nenhuma espécie, existindo grande controvérsia em relação ao seu uso. Há consenso na literatura de que o CO2, quando utilizado em concentrações e taxas de preenchimento da câmara inadequados, eleva o risco de comprometer o bem-estar animal. Não é um método aceito para neonatos.

- Deslocamento cervical (ratos <150 g, camundongos).

- Decapitação com equipamentos comerciais de uso específico tipo guilhotina (lâminas e tesouras afiadas devem ser utilizadas apenas em neonatos).

- Micro-ondas específicos para essa finalidade (não é aceito micro-ondas de uso doméstico).

- Congelamento rápido ou nitrogênio líquido para fetos e neonatos de ratos e camundongos.

- Atordoamento, seguido de exsanguinação (apenas em animais silvestres em situações de campo).

5.3 Métodos Inaceitáveis

- Éter, clorofórmio, nitrogênio, argônio e outros métodos não descritos na RN 37/2018.

6 | MÉTODOS DE EUTANÁSIA RECOMENDADOS PARA LAGOMORFOS (COELHOS) PELA RN 37 DO CONCEA (BRASIL, RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº37, 2018)

6.1 Métodos Recomendáveis:

- Barbitúrico intravenoso ou intraperitoneal (em casos excepcionais quando da

impossibilidade de administração intravenosa).

- Anestésicos gerais intravenosos (exemplo: propofol pela via intravenosa).

- Anestésicos inalatórios, seguidos, se necessário, de outros métodos para assegurar a morte.

- Após a perda do reflexo corneal, os métodos acima podem ser complementados por cloreto de potássio associado ou não a bloqueador neuromuscular, ambos por via intravenosa.

- Exsanguinação por punção cardíaca após anestesia geral.

6.2 Métodos Aceitos com restrição:

- Deslocamento cervical (<1 kg), apenas se previamente anestesiado.

- Decapitação com equipamento de uso específico tipo guilhotina (<1 kg); não pode ser realizada com tesoura ou lâmina.

- Atordoamento por eletronarcose, seguido de outro método que assegure a morte.

- Pistola de insensibilização ou dardo cativo, seguido de outro método que assegure a morte, em condições a campo e realizado por operador experiente e capacitado (animais selvagens).

6.3 Métodos Inaceitáveis:

- Atordoamento e deslocamento cervical (>1kg), CO2, nitrogênio, argônio, CO e outros métodos não descritos na RN 37/2018.

7 | EUTANÁSIA EM FETOS E NEONATOS DE ROEDORES E LAGOMORFOS

O CONCEA assegura que a eutanásia da mãe ou a remoção do feto em camundongo, rato e hamster até o 14º dia de gestação ocasiona morte rápida pela perda do suprimento sanguíneo, sendo um método aceitável para fetos até essa idade. Fetos acima de 2/3 de gestação e neonatos devem ser submetidos a eutanásia pelos mesmos métodos que seus congêneres adultos. Sempre que possível, o método de escolha para a eutanásia da mãe deve assegurar anóxia cerebral rápida para o feto. A RN também menciona que, para roedores e lagomorfos neonatos de até 7 dias, a decapitação com instrumentos que apresentem lâminas adequadas é um método aceito com restrição; e que para animais jovens e adultos de camundongos, hamsters, ratos ou cobaias, pode-se utilizar caixa hermeticamente fechada, com algodão embebido em halotano, isoflurano ou sevoflurano, desde que não haja contato direto do animal com o algodão, devendo ser a caixa transparente para a visualização do momento do óbito do animal, confirmado a seguir

pela ausência de reflexo corneal e batimentos cardíacos (BRASIL, Resolução Normativa Nº37, 2018). O_2 suficiente deve ser fornecido durante o período de indução dentro da caixa para evitar hipóxia. No caso de pequenos roedores colocados em um recipiente grande, haverá O_2 suficiente na câmara para evitar hipóxia (AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals., 2020).

Para fetos ou recém-nascidos, dois fatores devem ser levados em consideração ao escolher o método de eutanásia: os animais são mais resistentes à hipóxia e a biotransformação dos fármacos é mais lenta. Portanto, dois métodos aceitáveis para a espécie devem ser combinados e a morte deve ser confirmada utilizando os sinais descritos anteriormente (BRASIL, Resolução Normativa Nº37, 2018).

Em estudo feito em 2020 por Pinto, Corrêa e Silva, foram avaliados dois métodos de eutanásia de 70 neonatos de *Swiss webster* utilizando Isoflurano. Foi utilizado o aparelho de anestesia com vaporizador universal (34 neonatos) e a gaze embebida no anestésico (36 neonatos), como formas de fornecimento do isoflurano. Foram mensurados o LORR (*loss of the righting reflex*), que determina, de acordo com a literatura, o tempo até a inconsciência; o LOPR (*loss of the pedal withdrawal reflex*), a perda dos reflexos de pinçamento de pata e cauda, que indica a entrada no plano cirúrgico; a parada cardíaca através de doppler vascular; os RGA (resíduos de anestésicos no ambiente); e ainda foi avaliado o custo em R$ e o gasto em mL em cada tipo de fornecimento de isoflurano.

Em ambos os grupos, após detecção da parada cardíaca, os neonatos eram colocados por pelo menos 10 minutos em ar ambiente sem contato com o isoflurano. No grupo aparelho, foi utilizado um tempo de corte de 40 minutos para detecção da parada cardíaca. Caso a parada não fosse detectada nesse tempo, o neonato tinha sua eutanásia finalizada com a metdologia da gaze (PINTO, CORRÊA, & SILVA, 2020).

A média de LORR para o Grupo Gaze foi de 33,69 segundos (±7,93 segundos), enquanto o LOPR obteve média de 339,61 segundos (±76,52 segundos). A média de tempo até a parada cardíaca foi de 923,05 segundos (±358,60 segundos). 94,45% dos neonatos não retornaram seus batimentos cardíacos após os 10 minutos. Somente dois neonatos (5,55%) retornaram seus batimentos cardíacos durante esse tempo fora da exposição ao isoflurano e precisaram ser reexpostos à inalação do gás anestésico. A média do volume utilizado de isoflurano por neonato no Grupo Gaze foi de 10,55mL (±2,9mL), com custo médio de R$8,33/animal (±R$1,80 (PINTO, CORRÊA, & SILVA, 2020).

A média de LORR para o Grupo Aparelho foi de 37,32 segundos (±11,80 segundos), enquanto o LOPR obteve média de 563,32 segundos (±263,15 segundos). 52,95% dos neonatos do Grupo Aparelho (18 neonatos) não apresentaram parada cardíaca dentro dos 40 minutos (2400 segundos) estipulados de corte. 47,05% dos neonatos (16 neonatos) vieram a óbito dentro dos 40 minutos (2400 segundos) estipulados de corte; desses, 6,25% (1 neonato) retornou os batimentos cardíacos após os 10 minutos sem contato com o isoflurano, sendo então colocado na câmara com gaze embebida com 10mL de isoflurano.

O tempo médio para parada cardíaca desse grupo foi de 1979 segundos (±499,16 segundos). A média do volume utilizado de isoflurano por neonato no Grupo Aparelho foi de 75,05mL (±16,06 mL) com custo médio de R$59,29/animal. Ficou bastante evidente que a utilização do aparelho de anestesia produz uma contaminação ambiental muito maior que o uso de gaze emebida em isoflurano na câmara anestésica (±R$12,68) (Tabela1) (PINTO, CORRÊA, & SILVA, 2020).

Grupos	LORR (seg)	LOPR (seg)	Parada cardíaca (seg)
Gaze	33,69 (±8,04)	339,61 (±76,52)	923,05 (±358,60)
Aparelho	37,32 (±11,80)	563,32 (±263,15)	1979 (±499,16)

LORR= loss of the righting reflex; LOPR= loss of the pedal withdrawal reflex; seg= segundos; mL= mililitros. LORR – p<0,01. LOPR – p< 0,01.

Tabela 1- Dados comparativos entre os grupos gaze e aparelho para avaliações de LORR, LOPR e parada cardíaca

A determinação do tempo que os neonatos levaram até a perda de reflexo de retirada de pata e cauda ao pinçamento (LOPR), ou seja, perda do reflexo de dor profunda, pode ser utilizada como tempo aproximado que esses animais entram em plano cirúrgico com a perda dos reflexos. A utilização desse método em associação a um método físico, como a decapitação, é outra opção segura de eutanásia.

Para terminarmos, cabe recordar que a eutanásia deve fazer parte do projeto de pesquisa enviado à CEUA; os operadores deverão receber treinamento adequado para o método de eutanásia que será utilizado; os RTs devem supervisionar tudo relacionado a ela e os animais devem ser tratados com muito respeito e tranquilidade. Sendo esse tema tão delicado, cabe muita atenção para evitarmos dor e distresse aos animais e transtornos, como a fadiga por compaixão, nos operadores.

REFERÊNCIAS

AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals. (2020, Janeiro). **American Veterinary Medical Association**, 121. doi:ISBN 978-1-882691-54-8

BRASIL. (2008, outubro 08). **Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008**. Retrieved janeiro 10, 2018, from “Regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico dos animais; revoga a Lei Nº6.638, de 08 de maio de 1979; e dá outras providências.”: http://www.planaltp.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm

BRASIL. (2018, fevereiro 15). **Resolução Normativa nº 37**. Retrieved janeiro 10, 2018, from “Baixa diretriz da prética de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.”: http://www.mcti.gov.br/mcti/export/site/institucional/CONCEA/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/RN-37.pdf

LAFOLLETTE, M. R.; RILLEY, M. C.; CLOUTIER, S.; BRADY, C. M.; O'HAIRE, M. E. & GASKILL, B. N. (2020, march 05). Laboratory Animal Welfare Meets Humane Welfare: A Cross-Sectional Study of Professional Quality of Life, Including Compassion Fadigue in Laboratory Animal Personnel. **Frontiers in Veterinary Science,** 7. doi:10.3389/fvets.2020.00114

LAGO, K. & CODO, W. (2013, junho). Fadiga Por Compaixão: Evidências de Validade Fatorial e Consistência Interna do ProQol-Br. **Estudos dePsicologia***,* 18, pp. 213-221. Retrieved setembro 20, 2021, from https://www.scielo.br/j/epsic/a/vyz5Lg35SHqNZc83ZM39BPz/abstract/?lang=pt

NEWSOME, J. T.; CLEMMONS, E. A.; FITZHUGH, D. C.; GLUCKMAN, T. L.; CREAMER-HENTE, M. A.; TAMBRALLO, L. J. & WILDER-KOFIE, T. (2019, maio). Compassion Fatigue, Euthanasia Stress, and Their Managementin Laboratory Animal Research. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science***,* 58(3), pp. 289-292. doi:10.30802/AALAS-JAALAS-18-000092

PINTO, M. S.; CORRÊA, G. & SILVA, K. S. (2020, junho). **Análise Comparativa de Dois Métodos de Eutanásia Por Overdose de Anestésico Inalatório em Neonatos de Camundongos de Siess Webster**. Dissertação de Mestrado.

ZANI, G. L.; ROSA, C. L. & MACHADO, M. A. (2020, janeiro). Sindrome de Burnout e a Fadiga da Compaixão: das Vulnerabilidades dos Profissonais de Veterinária. **Brazilian Journal of Development***,* 6(1), pp. 4107-4123. Retrieved setembro 20, 2021, from https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/6390/5655

FERRAMENTAS TECNOLÓGICAS PARA O REFINAMENTO EXPERIMENTAL

Data de aceite: 03/07/2023

Klena Sarges Marruaz da Silva
Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos/Fundação Oswaldo Cruz (ICTB/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ
ORCID 0000-0002-5996-490X

1 | INTRODUÇÃO

A realização de pesquisas biomédicas e testes para assegurar o uso de produtos médicos humanos e veterinários ainda são inevitáveis na atualidade, devido à falta de métodos alternativos validados em número suficiente para substituir completamente a utilização de animais não humanos em pesquisas. Portanto, apesar de não tão debatido pela sociedade quanto à substituição e redução do uso de animais para esses fins (***R**eplacement* – ***R**eduction*), o refinamento é um **R** que merece melhor atenção para aplicação do Princípio dos 3Rs preconizado por Russel e Burch (1959) e da Cultura do Cuidado (HAWKINS; BERTELSEN, 2019).

Para que os animais possam experienciar menor sofrimento e melhorar o seu bem-estar durante as práticas biomédicas, é necessário um olhar apurado e cauteloso dos técnicos, médicos veterinários e pesquisadores envolvidos no manejo desses animais, e, para tal, o uso de ferramentas tecnológicas apoiando a prática dos 3Rs e auxiliando uma avaliação mais sensível do grau de exposição dos animais a procedimentos invasivos é e será essencial neste século.

A tecnologia da informação é aliada da transformação social e da passagem para uma sociedade 5.0, que não deve ser somente automatizada, conectada e auxiliada pelo aprendizado das máquinas para resolução e predição de problemas futuros (SILVA *et al.*, 2021), mas sobretudo concatenada com a resolução de desafios atuais lançados pela sociedade civil, como o respeito aos animais e práticas que comprovem nossa consciência da senciência animal.

Desta forma, neste capítulo abordaremos métodos inovadores para aplicação do refinamento na anamnese clínica e comportamental de animais

submetidos a procedimentos, os quais devem ser adotados na experimentação animal para apoiar uma boa avaliação do Ponto Final Humanitário.

2 | EXAMES POR IMAGEM E *WEARABLES* NA ANAMNESE DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Diferentes intervenções experimentais em animais de laboratório, como cirurgias, inoculações ou mesmo procedimentos de manejo, podem provocar respostas de estresse de curta duração ou mesmo distresse. Os sinais de angústia e dor que os animais manifestam durante esses procedimentos são avaliados por indicadores do estado físico, bioquímico e psicológico dos animais, tais como mudanças no peso corporal e sistemas de pontuação clínica, como já descritos nos capítulos anteriores.

Várias são as tecnologias já disponíveis para avaliar esses indicadores, tais como exames por imagem que permitem maior acurácia, como a ultrassonografia em 3D, a tomografia e a ressonância magnética, os quais permitem avaliar o interior dos organismos dos animais e analisar, por exemplo, o crescimento de tumores ou o alastramento de infecções virais e bacterianas, sem a necessidade de cirurgias exploratórias ou coletas de sangue contínuas.

O uso da telemetria não invasiva no monitoramento de parâmetros fisiológicos de animais submetidos a pesquisas já é uma realidade desde a década de 1990 (O'NEILL *et al*., 1990) e consiste no uso de sensores posicionados nos animais, sem a necessidade de implantação cirúrgica, para avaliação dos parâmetros fisiológicos. Ao se utilizar a transmissão de dados via *wireless* (por isso considerado um *Wearable* - um produto tecnológico utilizado acoplado ao corpo), permite-se a avaliação de animais, conscientes e com suas atividades no alojamento normalmente mantidas, em tempos curtos ou prolongados, pois se utiliza de sensores/transdutores que são adaptados a uma jaqueta que deve ser vestida no animal a ser estudado (SILVA *et al*., 2021) (Figura 1). A telemetria não invasiva não só permite a correlação entre os sinais de dor e os parâmetros de atividade, pressão arterial e eletrocardiograma, como fornece dados considerados mais preditivos, uma vez que já é conhecida a interferência da contenção em animais de laboratório nos parâmetros avaliados em um experimento, incluindo aumentos na temperatura corporal, frequência cardíaca e pressão arterial, níveis plasmáticos de epinefrina e norepinefrina, mudanças nas respostas a medicamentos e diminuição da ingestão de alimentos e peso corporal (KRAMER, 2000; KRAMER *et al*., 2001).

Embora haja uma necessidade de adaptação dos animais às jaquetas e transdutores, a telemetria não invasiva vem sendo cada vez mais utilizada, inclusive para animais de médio porte, como cães e primatas não humanos, facilitando, principalmente, o acompanhamento de estudos toxicológicos (CHUI *et al*., 2009; MITCHELL *et al*., 2010), pois estudo retrospectivo demonstrou que o uso da telemetria invasiva (que utiliza o

implante cirúrgico dos sensores) ainda apresenta vieses e uma qualidade de baixa a média na reprodutibilidade dos experimentos (GKROUZOUDI; TSINGOTJIDOUA; JIRKOF, 2022).

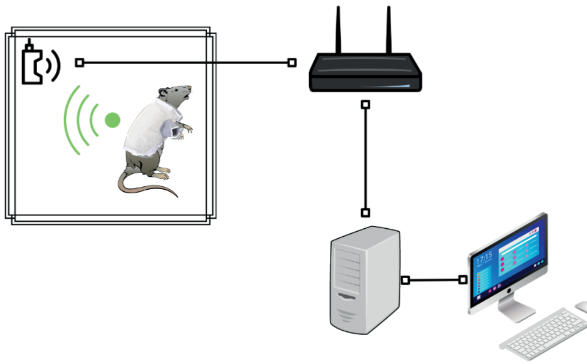


Figura 1. Transmissão de dados de parâmetros fisiológicos a partir de *wearables* para animais experimentais – Telemetria não invasiva

Fonte: Klena S. M. Silva, 2023.

3 | A INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL COMO FERRAMENTA PARA AVALIAÇÃO DA DOR E BEM-ESTAR DE ANIMAIS UTILIZADOS EM PESQUISAS

Mudanças comportamentais, como manutenção de atividades cotidianas de roedores utilizados em pesquisas, como a escavação e a nidificação, refletem o estado psicológico dos animais. Sua permanência durante o período em que são observados na experimentação indicam bem-estar, e a deterioração da atividade dessas atividades em camundongos e ratos pode indicar distúrbio neurológico, dor e estresse (JIRKOF, 2014).

Um dos tópicos importantes para aplicação correta do ponto final humanitário é a exclusão de procedimentos que causem dor injustificável aos animais. Nesse sentido, algumas soluções tecnológicas estão disponíveis para avaliação de parâmetros fisiológicos e comportamentos manifestados que são associados à expressão de dor.

A mensuração da sensação de dor é especialmente difícil em roedores porque eles não são verbais. Escalas criadas a partir da observação da forma como algumas regiões do corpo se apresentam, em especial da face, como as *Grimace Scale* (LANGFORD *et al.*, 2010; LEACH *et al.*, 2012; SOTOCINAL *et al.*, 2011), indicam-nos comportamentos que podem auxiliar na inferência do estágio de dor, porém ainda não são precisas para guiar um ponto final humanitário seguro. As *Grimace Scale*, particularmente, não funcionam bem com experimentos que envolvem modelos de dor neuropática, com exceção do modelo de

lesão por constrição crônica na área do trigêmeo (AKINTOLA *et al*., 2017). Assim, algumas ferramentas tecnológicas estão sendo elaboradas a partir de estímulos nociceptivos mecânicos ou térmicos que permitem observar os comportamentos dos camundongos e categorizá-los em reações associadas a dor e desconforto ou ausência destes (VIDAL *et al*., 2022).

Abdus-Saboor *et al*. (2019), ao perceberem que seria necessário avançar em ferramentas que pudessem auxiliar em uma aferição de grau de dor mais acurada, desenvolveram um método objetivo para avaliar a sensação de dor em camundongos a partir da videografia de alta velocidade para capturar características comportamentais, em menos de um segundo, após a estimulação da pata traseira com estímulos nocivos e inócuos, identificando vários parâmetros de diferenciação que indicam os aspectos afetivos e reflexivos da nocicepção, a partir do reflexo de retirada da pata traseira. O método utilizado pelos pesquisadores utilizou modelagem estatística e aprendizado de máquina (inteligência artificial) para criar uma outra escala de dor de camundongos que permite avaliar a sensação de dor de maneira graduada para cada retirada de estímulo invasivo. De modo interessante, o experimento demonstrou que camundongos de linhagens e sexos diferentes parecem apresentar limiares diferentes de dor frente aos mesmos estímulos, demonstrando que o uso da inteligência artificial pode nos ajudar a compreender de maneira mais assertiva o limite para manutenção de animais em experimentos que requeiram alto grau de invasividade ou repetições de inoculações ou administrações parenterais, incluindo o conhecimento sobre aquelas linhagens e sexo que devam ser excluídos em função da sensibilidade maior a procedimentos desse tipo.

O desenvolvimento de ferramentas que utilizam inteligência artificial para esse fim continua avançando e utilizando técnicas mais evoluídas como *deep learning*, que utiliza redes neurais profundas, encontradas nas plataformas DeepLabCut, LEAP, SLEAP, aplicadas para avaliar os padrões comportamentais de vários animais ao mesmo tempo (FRIED *et al*., 2020).

Fazemos aqui um "breve aparte" no texto para melhor compreensão dos colegas sobre o emprego dessas tecnologias.

Fundamentalmente, inteligência artificial por aprendizado de máquina ou *machine learning* é a utilização de algoritmos para extrair informações de dados brutos e representá-los através de algum tipo de modelo matemático. Esse modelo **é**, então, utilizado para fazer inferências a partir de outros conjuntos de dados. Já *deep learning* ou redes neurais artificiais de Aprendizado Profundo é uma das áreas da inteligência artificial que emprega algoritmos para processar dados e imitar o processamento feito pelo cérebro humano, aumentando a capacidade da máquina de registrar padrões que, muitas vezes, não são óbvios para o próprio cérebro humano; assim, utilizam camadas e camadas a mais de informações para estabelecer padrões para categorizações. Graças ao uso de *deep learning,* é possível elaborar soluções tecnológicas com visão computacional, reconhecimento de

fala, processamento de linguagem natural e reconhecimento de áudio (DATA SCIENCE ACADEMY, 2022).

Muito se ouve também sobre o emprego de redes neurais convolucionais profundas (CNN), que é também um algoritmo de Aprendizado Profundo, mas que pode captar uma imagem de entrada, atribuir importância (pesos e vieses que podem ser aprendidos) a vários aspectos/objetos da imagem e ser capaz de diferenciar um do outro. O pré-processamento exigido em uma CNN é muito menor em comparação com outros algoritmos de classificação. Enquanto nos métodos primitivos os filtros são feitos à mão, com treinamento suficiente, as CNN têm a capacidade de aprender esses filtros/características, pois sua arquitetura é análoga ao padrão de conectividade de neurônios no cérebro humano e foi inspirada na organização do córtex visual, por isso é particularmente bem adaptada para classificar imagens (DATA SCIENCE ACADEMY, 2022).

A plataforma chamada DeepLabCut, já amplamente adotada em toda a comunidade de neurociência comportamental, usa redes neurais profundas para realizar a estimativa de posturas sem a necessidade de colocar marcadores refletivos nos animais. A plataforma foi construída a partir de um algoritmo de estimativa de posturas anterior chamado DeeperCut, que usava milhares de conjuntos de dados rotulados para rastrear com precisão partes do corpo de humanos envolvidos em diversas tarefas, desde remar até arremessar uma bola de beisebol, demonstrando que a translação pode ser inversa ao adaptarmos ferramentas tecnológicas já existentes para uso em humanos aos animais experimentais (FRIED *et al.*, 2020).

Na atualidade, já foram desenvolvidos ou estão em desenvolvimento alguns aplicativos (tanto em versões para uso em web ou versão para uso em celulares) para reconhecimento de dor e bem-estar em animais de laboratório, que utilizam o reconhecimento facial e empregam inteligência artificial (*deep learning*).

O Rodent Face Finder® (TUTTLE *et al.*, 2018) identifica e extrai quadros de vídeo quando camundongos ou ratos estão de frente para a câmera. No entanto, esse software não elimina dois dos aspectos mais demorados e subjetivos do uso de escalas de careta: treinar pessoal de laboratório para pontuar imagens e pontuar o grande número de imagens que são geradas como parte de cada experimento. A adoção generalizada de escalas de caretas tem sido limitada como resultado, apesar de essas escalas serem reproduzíveis entre laboratórios e preverem com precisão a eficácia analgésica.

Vidal e colaboradores das universidades do Texas e de Houston (EUA) (2022) desenvolveram um software que pode detectar automaticamente o nível de dor nos ratos a partir do aprendizado de máquina e visão computacional baseados em *deep learning,* capaz de detectar faces frontais de camundongos albinos e estimar o nível de dor usando pistas oculares. O software prevê o nível de aspecto facial da dor em níveis de 0 (não dor) a 2 (dor moderada) com base no aperto orbital espontâneo dos animais, apresentando média de 97.2% de acurácia.

Na Alemanha, a união de cientistas de dados do Departamento de Visão Computacional e sensoriamento remoto da Technische Universität Berlin e profissionais especialistas em Ciência em Animais de Laboratório da Freie Universität Berlin proporcionou a elaboração de um software totalmente automatizado para a vigilância dos efeitos pós-cirúrgicos e pós-anestésicos em camundongos, que utiliza duas arquiteturas de rede neural convolucional profunda (CNN) de última geração pré-treinadas (ResNet50 e InceptionV3) e a compararam com uma terceira arquitetura CNN sem pré-treinamento. Os resultados iniciais da aplicação da ferramenta em camundongos C57/BL6 alcançou uma precisão de até 99% para o reconhecimento da ausência ou presença de efeitos pós-cirúrgicos e/ou pós-anestésicos a partir da análise da expressão facial (reconhecimento facial) (Figura 2). O objetivo final do software é a disponibilização futura de um "mini-isolador inteligente", com monitoramento 24 horas por vídeo de expressões faciais, bem como outros parâmetros comportamentais e uma função de alerta indicando que o bem-estar de um animal está prejudicado. Está ainda nos planos da equipe o uso do software em versão app (aplicativo) que apoie o médico veterinário e membros da equipe de pesquisa na avaliação do ponto final humanitário a partir da *Grimace Scale* (ANDRESEN *et al*., 2020).

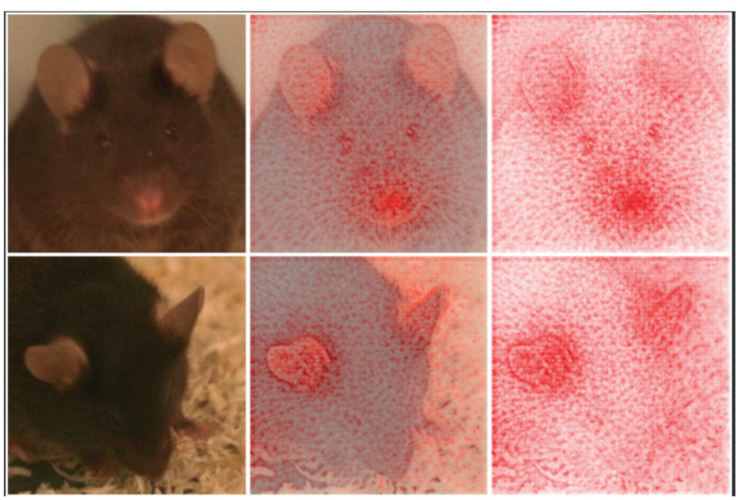


Figura 2. Visualização do processo de tomada de decisão pelos algoritmos treinados por Andresen e colaboradores (2020) com imagens geradas a partir de orelhas, focinho e vibrissas e imagem original combinada com mapa de calor utilizada

Fonte: Andressen *et al*., 2020.

Na China, o DeepMGS também utiliza CNN a partir da classificação da *Grimace Scale* para camundongos, corta automaticamente as imagens do rosto do animal, mapeia as áreas por calor, prevê pontuações de unidades de ação e pontuações totais na *Grimace*

Scale e, por fim, infere se existe dor com uma precisão de 70–90% (CHIANG *et al*., 2022).

Embora os softwares que utilizam o reconhecimento facial a partir da *Grimace Scale* ainda apresentem uma classificação binária simples nas categorias “sem dor” e “com efeito dor”, a intenção é o refinamento contínuo dos softwares para uma classificação mais complexa, envolvendo as inúmeras variáveis correlacionadas ao protocolo de pesquisa adotado, que podem influenciar na manifestação de dor e angústia em animais de laboratório, e outros repertórios comportamentais que não somente a observação da expressão facial.

Em geral, procedimentos cirúrgicos que incluem anestesia inalatória e tratamento analgésico, dependendo do manejo da analgesia, causam maior comprometimento do bem-estar do que apenas a anestesia inalatória, o que pode ser avaliado por parâmetros comportamentais, como construção de ninhos (JIRKOF *et al*., 2013 *apud* ANDRESEN *et al*., 2020). No entanto, quando assumimos que há dor pós-cirúrgica após a castração e que é improvável que a anestesia realizada induza à dor, eliminamos do *checklist* de avaliação de um bom protocolo e, portanto, da avaliação de ponto final humanitário, que a anestesia dissociativa cetamina e xilazina, por exemplo, pode danificar o tecido no local da injeção, o que pode ser associado a uma sensação dolorosa (WELLINGTON; MIKAELIAN; SINGER, 2013). A anestesia pode, ainda, induzir angústia pós-anestésica por diversas causas. O isoflurano pode produzir efeitos irritantes nas vias aéreas dos animais ao ativar os canais iônicos nociceptivos (MATTA *et al*., 2008). Assim, as técnicas de aprendizado de máquina que serão aplicadas futuramente tendem a melhorar a caracterização de comportamento de dor a partir da análise de outras tantas variáveis.

Não somente a *Grimace Scale* pode ser utilizada para avaliação de dor e distresse por meio desses softwares com desenvolvimento apoiado em *deep learning.* O DeepSqueak utiliza técnica de CNN (Faster-RCNN) e foi projetado para permitir a detecção e análise de vocalizações ultrassônicas de camundongos e ratos (aquelas que estão >20 kHz). Comparado com outros softwares modernos e análise manual, o DeepSqueak foi capaz de reduzir falsos positivos, aumentar a recuperação de detecção, reduzir o tempo de análise, otimizar a classificação automática de sílabas das vocalizações e executar a análise de sintaxe automática em números arbitrariamente grandes de sílabas, mantendo a revisão de seleção manual e classificação supervisionada. O software permite a gravação das vocalizações dos animais e análise de outros comportamentos que não somente a expressão de dor, fornecendo uma outra dimensão de *insights* sobre o comportamento quando combinados com medidas convencionais de resultados ou mesmo a avaliação a partir da *Grimace Scale* (COFFEY; MARX; NEUMAIER, 2019).

A aplicação de CNN também já está disponível para avaliação de dor em outras espécies animais utilizadas em pesquisas biomédicas, como o cavalo (ASK *et al*., 2020; LECIONE *et al*., 2021), também baseada na *Grimace Scale* da espécie, e para ovelhas, utilizando a técnica *Support Vector Machine* (SVM) (LU; MAHMOUD; ROBINSON, 2017),

que vem a ser um modelo de aprendizado supervisionado com algoritmos de aprendizado associados que analisam dados para classificação e análise de regressão (CORTES; VAPNIK, 1995).

Todos esses softwares e outros que estão em desenvolvimento, em breve, estarão disponíveis para utilização rotineira por profissionais que atuam na experimentação animal. Embora nenhum deles tenha manifestado ainda a intenção de serem disponibilizados ao mercado consumidor, essa expectativa é inevitável, uma vez que o desenvolvimento de soluções inovadoras mantém a premissa da inovação aberta, permitindo que a sociedade possa se beneficiar daquilo que é produzido na Academia.

4 | CENÁRIOS POSSÍVEIS PARA UM FUTURO COM USO MÍNIMO DE ANIMAIS EM PESQUISAS E FOCADO NO BEM-ESTAR ANIMAL

Dados sobre, por exemplo, quais os critérios e como um ponto final humanitário foi implementado durante um experimento, quais as práticas adotadas para avaliação do bem-estar de animais durante o experimento, quais são as tendências na gravidade real nos projetos e como são estes explicados, conforme indicam Hawkins e Bertelsen (2019) em sua visão sobre o papel do Refinamento na Cultura do Cuidado, poderão subsidiar plataformas com aplicação de inteligência artificial que realizem predições.

A transparência e a melhoria do bem-estar de animais utilizados em pesquisas, que antes eram um anseio somente da sociedade civil, vêm se tornando um objetivo para cientistas no mundo todo. Em 2018, após anos de reservas e omissão de informações acerca das condições de animais utilizados em pesquisas, 592 cientistas (incluindo 4 premiados com o Nobel), estudantes e trabalhadores de biotérios dos Estados Unidos publicaram uma carta no jornal *USA Today* que conclama as instituições de pesquisa americanas a realizarem a abertura de informações sobre suas pesquisas com animais (USA TODAY, 2022), demonstrando que o acesso e compartilhamento de dados sobre práticas de manejo durante a experimentação serão fundamentais para uma aplicação cada vez mais coerente do que chamamos de ponto final humanitário.

A Ciência Aberta pode ajudar a aumentar a transparência de muitas partes do processo de pesquisa, em especial o manejo com os animais, e sua implementação deve, portanto, ser considerada pelos pesquisadores da experimentação animal como uma oportunidade valiosa que pode contribuir para a adesão ao Princípio dos 3R e prática aprimorada do ponto final humanitário (NAWROTH; TOBIAS, 2022).

É fundamental o desenvolvimento de sistemas integrados e abertos baseados em computação em nuvem e de ponta, aplicativos e serviços. Embora a pesquisa tenha sido feita sobre precisão na agricultura, ainda há muito trabalho a ser feito na integração da rede de sensores especializada em sistemas com os atuais serviços e infraestrutura em nuvem, e abrindo os dados e sistemas para compartilhamento, programabilidade e

inovação adicional.

A melhoria dos *wearables* focada na minimização de vieses por estresse adaptativo de uso de jaquetas por animais e o desenvolvimento de IoTs (Internet das coisas - dispositivos dotados de tecnologia embarcada, sensores e conexão com a rede que são capazes de reunir e de transmitir dados) (CONNER, 2010) também são uma perspectiva presumível em um cenário de pleno desenvolvimento tecnológico pós-implantação da rede de internet 5G nos países aliados, à espera de uma próxima geração que trará como premissa obrigatória a manutenção do bem-estar animal em todas os domínios de relação entre animais humanos e animais não humanos.

REFERÊNCIAS

ABDUS-SABOOR, I.; FRIED, N. T; LAY, M.; BURDGE, J.; SWANSON, K.; FISCHER, R.; JONES, J.; DONG, P.; CAI, W.; GUO, X.; TAO, Y. X.; BETHEA, J.; MA, M.; DONG, X.; DING, L.; LUO, W. Development of a Mouse Pain Scale Using Sub-second Behavioral Mapping and Statistical Modeling. **Cell Reports**, v. 28, n. 6, p. 1623-1634.e4, 2019. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.017.

AKINTOLA, T.; RAVER, C.; STUDLACK, P.; UDDIN, O.; MASRI, R.; KELLER, A. The grimace scale reliably assesses chronic pain in a rodent model of trigeminal neuropathic pain. **Neurobiol Pain**, v. 2, p. 13-17, 2017.

ANDRESEN, N.; WÖLLHAF, M.; HOHLBAUM, K.; LEWEJOHANN, L.; HELLWICH, O.; THÖNE-REINEKE, C.; BELIK, V. Towards a fully automated surveillance of well-being status in laboratory mice using deep learning: Starting with facial expression analysis. **PLOS ONE**, v. 15, n. 4, e0228059, 2020. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228059.

ASK, K.; RHODIN, M.; TAMMINEN, LM.; ELIN HERNLUND, E.; ANDERSEN, P. H. Identification of body behaviors and facial expressions associated with induced orthopedic pain in four equine pain scales. **Animals**, v. 10, n. 11, p. 2155, 2020. https://doi.org/10.3390/ani10112155.

CHIANG, C.-Y.; CHEN, Y.-P.; TZENG, H.-R.; CHANG, M.-H.; CHIOU, L.-C.; PEI, Y.-C. Deep Learning-Based Grimace Scoring Is Comparable to Human Scoring in a Mouse Migraine Model. J**. Pers. Med.** v. 12, p. 851, 2022. https://doi.org/10.3390/jpm12060851.

CHUI, R. W.; FOSDICK, A.; CONNER, R.; JIANG, J.; BRUENNER, B. A.; VARGAS, H. M. Assessment of two external telemetry systems (PhysioJacket and JET) in beagle dogs with telemetry implants. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 60, n. 1, p. 58–68, 2009. https://doi.org/10.1016/j.vascn.2009.04.196.

COFFEY, K. R.; MARX, R. G.; NEUMAIER, J. F. DeepSqueak: a deep learning-based system for detection and analysis of ultrasonic vocalizations. **Neuropsychopharmacol***, v. 44, p.* 859–868, 2019. https://doi.org/10.1038/s41386-018-0303-6.

CONNER, M. Sensors empower the “Internet of Things”. **EDN**, v.10, p. 32-38, 2010.

CORTES, C.; VAPNIK, V. Support-vector networks. **Machine Learning**, v. 20, n. 3, p. 273–297, 1995. doi:10.1007/BF00994018.

DATA SCIENCE ACADEMY. **Deep Learning Book.** Disponível em: https://www.deeplearningbook.com.br/ doi: 10.3389/fvets.2022.810989

FRIED, N. T.; CHAMESSIAN, A.; ZYLKA, M. J.; ABDUS-SABOOR, I. Improving pain assessment in mice and rats with advanced videography and computational approaches. **Pain**, v. 161, n. 7, p. 1420-1424, 2020. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001843.

GKROUZOUDI, A.; TSINGOTJIDOU, A.; JIRKOF, P. A systematic review on the reporting quality in mouse telemetry implantation surgery using electrocardiogram recording devices, **Physiology & Behavior**, v. 244, 113645, 2022.

HAWKINS, P.; BERTELSEN, T. 3Rs-Related and Objective Indicators to Help Assess the Culture of Care. **Animals (Basel)**, v. 9, n. 11, p. 1-7, 2019. doi: 10.3390/ani9110969. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2021.113645.

JIRKOF, P. Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice, Journal of **Neuroscience Methods**, v. 234, p. 139-146, 2014. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.02.001.

JIRKOF, P.; FLEISCHMANN, T.; CESAROVIC, N.; RETTICH, A; VOGEL, J.; ARRAS, M. Assessment of postsurgical distress and pain in laboratory mice by nest complexity scoring. **Lab Anim**, v.47, p. 153–16, 2013.

JUKAN, A.; MASIP-BRUIN, X.; AMLA, N. Smart Computing and Sensing Technologies for Animal Welfare: A Systematic Review. **ACM Comput. Surv**, v. 50, n. 1, 2017. https://doi.org/10.1145/3041960.

KRAMER, K.; KINTER, L.; BROCKWAY, B. P.; VOSS, H. P.; REMIE, R.; VAN ZUTPHEN, B. L. The use of radiotelemetry in small laboratory animals: recent advances. **Contemporary topics in laboratory animal science**, v. 40, n. 1, p. 8–16, 2001.

KRAMER, K.; VOSS, H. P.; GRIMBERGEN, J. A.; MILLS, P. A.; HUETTEMAN, D.; ZWIERS, L.; BROCKWAY, B. Telemetric monitoring of blood pressure in freely moving mice: a preliminary study. **Laboratory animals**, v. 34, n. 3, 272–280, 2000. https://doi.org/10.1258/002367700780384663.

LANGFORD, D.; BAILEY, A.; CHANDA, M.; CLARKE, S.; DRUMMOND, T.; ECHOLS, S.; GLICK, S.; INGRAO, J.; KLASSEN-ROSS, T.; LACROIX-FRALISH, M.; MATSUMIYA, L.; SORGE, R.; SOTOCINAL, S.; TABAKA, J.; WONG, D.; VAN DEN MAAGDENBERG, A.M.M.; FERRARI, M.; CRAIG, K.; MOGIL, J. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. **Nature Methods**, v. 7, p. 447, 2010. 10.1038/nmeth.1455

LEACH, M. C.; KLAUS, K.; MILLER, A. L.; SCOTTO DI PERROTOLO, M.; SOTOCINAL, S. G.; FLECKNELL, P. A. The assessment of post-vasectomy pain in mice using behaviour and the Mouse Grimace Scale. **PLOS ONE**, v. 7, n. 4, e35656, 2012. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035656

LU, Y.; MAHMOUD, M.; ROBINSON, P. Estimating sheep pain level using facial action unit detection. *In*: **IEEE International Conference on Automatic Face & Gesture Recognition** (FG 2017) (pp. 394–399). Washington DC, USA, 2017. doi:10.1109/FG.2017.56

MATTA, J. A.; CORNETT, P. M.; MIYARES, R. L.; ABE, K.; SAHIBZADA, N.; AHERN, G. P. General anesthetics activate a nociceptive ion channel to enhance pain and inflammation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, p. 8784–8789, 2008.

MITCHELL, A. Z.; MCMAHON, C.; BECK, T. W.; SARAZAN, R. D. Sensitivity of two noninvasive blood pressure measurement techniques compared to telemetry in cynomolgus monkeys and beagle dogs. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 62, n. 1, 54–63, 2010. https://doi.org/10.1016/j.vascn.2010.04.005

NAWROTH, C.; TOBIAS, K. E. The Academic, Societal and Animal Welfare Benefits of Open Science for Animal Science. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, 2022.

O'NEIL, P. J.; KAUFMAN, L. N. Effects of indwelling arterial catheters or physical restraint on food consumption and growth patterns of rats: advantages of noninvasive blood pressure measurements techniques. **Lab. Anim. Sci**, v. 40, p. 641–643, 1990.

SILVA, J. M.; PONTES, A. N.; SARGES, K.; FERREIRA, M. L. Inovação e a ciência em animais de laboratório para pesquisas em saúde. *In:* SILVA, A. R.; SILVA, J. M.; SÓSTENES, E. Organizadores. **Comunicação e inovações tecnológicas na saúde**. Arapiraca: Eduneal, 2021. 109 p.

SOTOCINAL, S. G.; SORGE, R. E.; ZALOUM, A.; TUTTLE, A. H.; MARTIN, L. J.; WIESKOPF, J. S.; MAPPLEBECK, J. C. S.; WEI, P.; ZHAN, S.; ZHANG, S.; MCDOUGALL, J. J.; KING, O. D.; MOGIL, J. S. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. **Mol Pain**, v.7, p. 55, 2011.

TANNER, R. The 3Rs: What are Medical Scientists Doing about Animal Testing? **Front. Young Minds**, v. 6, n. 44, 2018. doi: 10.3389/frym.2018.00044.

TUTTLE, A. H.; MOLINARO, M. J.; JETHWA, J. F. *et al*. A deep neural network to assess spontaneous pain from mouse facial expressions. **Molecular Pain**, January 2018. doi:10.1177/1744806918763658.

USA TODAY. **Let's continue animal testing:** America's scientific community. Disponível em: https://www.usatoday.com/story/opinion/2018/06/20/lets-continue-animal-testing-americas-scientific-community/718331002/

VIDAL, A.; JHA, S.; HASSLER, S.; PRICE, T.; BUSSO, C. Face detection and grimace scale prediction of white furred mice. **Machine Learning with Applications**, v. 8, 100312, 2022. https://doi.org/10.1016/j.mlwa.2022.100312.

WELLINGTON, D.; MIKAELIAN, I.; SINGER, L. Comparison of ketamine–xylazine and ketamine–dexmedetomidine anesthesia and intraperitoneal tolerance in rats. **J Am Assoc Lab Anim Sci**., v. 52, p. 481–487, 2013. pmid:23849447

KLENA SARGES MARRUAZ DA SILVA - Médica veterinária formada pela Universidade Federal Rural da Amazônia; Doutora em Ciências da Saúde pela Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; Mestre em Ciência Animal pela Universidade Federal do Pará; Especialista em Tendências e Inovações pelo MBA/UniRitter. Pesquisadora Titular em Saúde Pública na Fundação Oswaldo Cruz. Docente Permanente dos Programas de pós-graduação Stricto Sensu em Ciência de Animais de Laboratório (Mestrado Profissional/FIOCRUZ/CAPES), Lato Sensu em Métodos Alternativos ao uso de Animais de Laboratório (Especialização/Fiocruz/BraCVAM/MEC) e Lato Sensu em Biotecnologia do Desenvolvimento Animal - (Especialização/Fiocruz/MEC). Pesquisadora integrante do INCT em Modelagem de Doenças Humanas Complexas com Plataformas 3D (Model3D). Líder do Grupo de Pesquisa Inovação em Ciência em Animais de Laboratório (Diretório Lattes/CNPq). Desenvolve projetos de soluções tecnológicas inovadoras para a Saúde Pública e para aplicação do Princípio dos 3Rs. Coordenadora do projeto de extensão em CTI HackGirls. Criadora e produtora do podcast Agora Entendi! Possui experiência na área de Ciência em Animais de Laboratório (criação de animais de laboratório, experimentação em primatas não humanos, divulgação científica) e inovação.

MONIQUE RIBEIRO DE LIMA - Médica Veterinária formada pela Universidade Federal Fluminense; Doutora em Ciências pelo programa de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia/Fiocruz; Mestre em Ciências pelo Instituto Nacional de Infectologia/Fiocruz; Responsável Técnica do Biotério de Experimentação do Centro de Experimentação Animal do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz; Docente colaboradora do Mestrado Profissional em Ciência em Animais de Laboratório e na pós-graduação lato sensu em Métodos Alternativos ao Uso de Animais de Laboratório do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos/Fiocruz; Docente colaboradora dos cursos de Experimentação Animal do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz. Possui experiência na área de imunologia, doenças infecciosas, ensaios pré-clínicos in vivo, experimentação com roedores, lagomorfos e primatas não humanos.

AMANDA DOS SANTOS CAVALCANTI - Médica Veterinária; Pós-doutorado pela Queensland University of Technology; Doutora em Ciências; Mestre em Medicina Veterinária; Especialista em Segurança Alimentar e Qualidade; Responsável Técnica pela Unidade de Pesquisa Experimental em Ortopedia do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad; Docente do Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad.

ANDRÉ SECUNDINO ABBAGLIATO - Graduado em Direito; Mestre em Ciências em Animais de Laboratório; Técnico em produção de biomodelos, no ICTB/Fiocruz; Docente colaborador no mestrado profissional em Ciências em Animais de Laboratório e na pós-graduação lato sensu em Métodos Alternativos ao Uso de Animais de Laboratório no Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos/Fiocruz.

AUGUSTO CÉSAR ARAGÃO OLIVEIRA - Graduado em Ciências Biológicas; Doutor em Biotecnologia; Mestre em Patologia; Técnico de laboratório do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará; Docente junto ao Departamento de Biologia do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará; Docente junto ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

CAYO ANTÔNIO SOARES DE ALMEIDA - Biólogo; Mestre pelo programa de pós-graduação em Ciências, área de concentração em Fisiologia; Doutorando no programa de pós-graduação em Neurociência e Cognição; Biólogo dos biotérios da Universidade Federal do ABC no campus de São Bernardo do Campo; Docente no curso de medicina da Universidade Municipal de São Caetano do Sul.

CLEIDE FALCONE - Zootecnista; Pós-doutorado pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; Doutora em Psicologia (Área de Concentração: Neurociências e Comportamento); Mestre em Psicologia; Pesquisadora Independente e Consultora na área de Comportamento, Bem-Estar Animal e Implementação dos 3Rs. Docente dos cursos oferecidos pelo Cambridge E-Learning Institute nas áreas de comportamento e Bem-Estar de Animais de Laboratório e Ética no Uso Animal.

DAIANI COTRIM DE PAIVA CAMPBELL - Graduada em Ciências Biológicas; Mestre em Ciência em Animais de Laboratório; Técnica em Agropecuária e em Biotecnologia em Saúde; Técnica em Saúde Pública do Biotério de Experimentação do Centro de Experimentação Animal do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz.

ISABELE BARBIERI DOS SANTOS - Médica Veterinária; Doutora em Ciências com ênfase em esporotricose e zoonoses emergentes; Mestre em Ciências;

Tecnologista em Saúde Pública do Centro de Experimentação Animal do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz; Docente permanente do Curso de Mestrado Profissional em Ciências em Animais de Laboratório do ICTB/Fiocruz; Docente dos cursos de Experimentação Animal do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz.

JACKLINE DE PAULA AYRES DA SILVA - Graduada em Ciências Biológicas; Pós-doutorado em Oncologia; Doutora em Oncologia; Mestre em Ciências Morfológicas; Especialista em Ciências do Laboratório Clínico; Pesquisadora Associada no Laboratório de Medicina Experimental e Saúde do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz; Docente da pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz.

JOÃO ANTÔNIO MATHEUS GUIMARÃES - Médico; Doutor em Medicina (Ciências Médicas); Mestre em Medicina (Ortopedia e Traumatologia); Médico do Ministério da Saúde no Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad; Docente do curso de Mestrado Profissional em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético no Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad.

KLENA SARGES MARRUAZ DA SILVA - Médica veterinária formada pela Universidade Federal Rural da Amazônia; Doutora em Ciências da Saúde pela Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; Mestre em Ciência Animal pela Universidade Federal do Pará; Especialista em Tendências e Inovações pelo MBA/UniRitter. Pesquisadora Titular em Saúde Pública na Fundação Oswaldo Cruz. Docente Permanente dos Programas de pós-graduação Stricto Sensu em Ciência de Animais de Laboratório (Mestrado Profissional/FIOCRUZ/CAPES), Lato Sensu em Métodos Alternativos ao uso de Animais de Laboratório (Especialização/Fiocruz/BraCVAM/MEC) e Lato Sensu em Biotecnologia do Desenvolvimento Animal - (Especialização/Fiocruz/MEC). Pesquisadora integrante do INCT em Modelagem de Doenças Humanas Complexas com Plataformas 3D (Model3D). Líder do Grupo de Pesquisa Inovação em Ciência em Animais de Laboratório (Diretório Lattes/CNPq).

MARIA INÊS DORIA ROSSI - Médica Veterinária; Pós-doutorado pela Fiocruz; Doutora em Biologia Celular e Molecular; Mestre em Medicina Veterinária; Tecnologista em Saúde Pública do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos/Fiocruz; Docente permanente do Curso de Mestrado Profissional em Ciências em Animais de Laboratório do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos /Fiocruz; Docente dos cursos de especialização em Métodos Alternativos ao uso de Animais de Laboratório e Biotecnologias do Desenvolvimento Animal do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos/Fiocruz; Conteudista do curso EAD em Iniciação em Ciências em Animais de Laboratório do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos/Fiocruz.

MARIANA BOECHAT DE ABREU - Médica Veterinária; Doutora em Medicina e Cirurgia Animal; Mestre em Clínica e Reprodução Animal; Mestre em ciência e Bem-Estar Animal; Docente do mestrado profissional para pesquisa Biomédica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/UFRJ; Professora Adjunta vinculada ao Laboratório de Fisiologia da Respiração do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/UFRJ; Colaboradora em pesquisa na Universidad Complutense de Madrid.

MONICA DA SILVA NOGUEIRA - Médica Veterinária; Mestre em Ciência em Animais de Laboratório; Responsável Técnica do Biotério de Experimentação do Centro de Experimentação Animal do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz; Docente colaboradora dos cursos de Experimentação Animal do Instituto Oswaldo Cruz/ Fiocruz.

MONICA SOUZA FERREIRA PINTO - Médica Veterinária; Mestre em Ciência de Animais de Laboratório; Especialista em clínica médica avançada de pequenos animais; Docente colaboradora do Mestrado Profissional em Ciência em Animais de Laboratório e na pós-graduação lato sensu em Métodos Alternativos ao Uso de Animais de Laboratório do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos/ Fiocruz; Médica Veterinária na criação/produção de roedores e lagomorfos do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos/Fiocruz.

MONIQUE RIBEIRO DE LIMA - Médica Veterinária; Doutora em Ciências, com ênfase em imunologia; Mestre em Ciências; Responsável Técnica do Biotério de Experimentação do Centro de Experimentação Animal do Instituto Oswaldo Cruz/ Fiocruz; Docente colaboradora do Mestrado Profissional em Ciência em Animais de Laboratório e na pós-graduação lato sensu em Métodos Alternativos ao Uso de Animais de Laboratório do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos/ Fiocruz; Docente colaboradora dos cursos de Experimentação Animal do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz.

MURILO VIEIRA DA SILVA - Médico Veterinário; Doutor em Imunologia e Parasitologia Aplicadas; Mestre em Imunologia e Parasitologia Aplicadas; Responsável Técnico pelos Biotérios da Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia; Docente do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação; Docente do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade Federal de Uberlândia;

PABLO CORRÊA COSTA DE ALMEIDA - Médico Veterinário; Mestrando em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético; Especialista em Ortopedia; Especialista em anestesiologia e cirurgia em pequenos animais.

RENATA BATISTA DA SILVA - Médica Veterinária; Doutoranda em Bioética; Mestre em Formação para a Pesquisa Biomédica; -Especialista em Toxicologia

aplicada à Vigilância em Saúde; Técnica em Biotecnologia; Tecnologista da área de Recursos Animais do Instituto Nacional de Câncer.

RODRIGO MULLER - Médico Veterinário; Doutorando em Ciências e Biotecnologia; Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos; Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos; MBA em Gestão Industrial de Imunobiológicos; Gerente do Laboratório de Ensaios Pré-clínicos de Bio-Manguinhos/Fiocruz; Docente colaborador no mestrado profissional em Ciências em Animais de Laboratório no Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos/Fiocruz.

TAYS FREITAS MARTINS BENTO - Médica Veterinária; Mestre em Ciências e Biotecnologia; Técnica em Biotecnologia; Técnica do biotério de experimentação animal do Instituto Nacional de Câncer.

WESLEY LYEVERTON CORREIA RIBEIRO - Médico Veterinário; Graduando em Filosofia; Doutor em Ciências Veterinárias; Mestre em Ciências Veterinárias; Especialista em Informática em Saúde; Especialista em Saúde Pública; Responsável Técnico no Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará; Docente permanente do Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional da Universidade Federal do Ceará; Pesquisador colaborador do Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Estadual do Ceará.

YULI RODRIGUES MAIA DE SOUZA - Bióloga; Doutora em Biologia Celular e Molecular; Mestre em Biologia Celular e Molecular; Especialista em Educação; Especialista técnica em Biologia Parasitária e Biotecnologia; Técnica em Biotecnologia; Docente de Ciências para a Educação Básica.

O **Guia de Finalização Humanitária aplicada a roedores utilizados em pesquisas** foi produzido por profissionais da Ciência em Animais de Laboratório brasileira, com objetivo de colaborar com seus conhecimentos para a reflexão e a melhor prática possível do ponto final humanitário.

A obra fornece informações sobre a prática do *endpoint* nos principais tipos de experimentos realizados com animais, sem deixar de lado informações igualmente relevantes como: a Cultura do Cuidado; o detalhamento da legislação que embasa a aplicação do momento do ponto final humanitário; a avaliação de dor e bem-estar, além de possíveis intervenções clínicas; a importância de uma eutanásia igualmente humanitária, bem como da manutenção de um bom controle de qualidade e segurança no experimentos e, para finalizar, algumas das inúmeras possibilidades que a tecnologia atualmente nos apresenta para apoiar a avaliação do bem-estar animal.

A obra não pretende somente difundir conhecimento sobre o tema, mas também provocar um debate aprofundado, evocando a importância de respeitar os animais.

REALIZAÇÃO

FIOCRUZ

ICTB
Instituto de Ciência e
Tecnologia em Biomodelos

Atena Editora
Ano 2023

O **Guia de Finalização Humanitária aplicada a roedores utilizados em pesquisas** foi produzido por profissionais da Ciência em Animais de Laboratório brasileira, com objetivo de colaborar com seus conhecimentos para a reflexão e a melhor prática possível do ponto final humanitário.

A obra fornece informações sobre a prática do *endpoint* nos principais tipos de experimentos realizados com animais, sem deixar de lado informações igualmente relevantes como: a Cultura do Cuidado; o detalhamento da legislação que embasa a aplicação do momento do ponto final humanitário; a avaliação de dor e bem-estar, além de possíveis intervenções clínicas; a importância de uma eutanásia igualmente humanitária, bem como da manutenção de um bom controle de qualidade e segurança no experimentos e, para finalizar, algumas das inúmeras possibilidades que a tecnologia atualmente nos apresenta para apoiar a avaliação do bem-estar animal.

A obra não pretende somente difundir conhecimento sobre o tema, mas também provocar um debate aprofundado, evocando a importância de respeitar os animais.

REALIZAÇÃO

FIOCRUZ

ICTB
Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos

Atena Editora
Ano 2023